

03.03.00

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

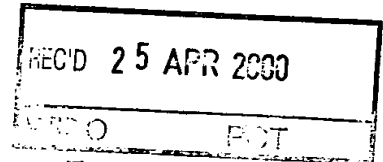
JP00/1294

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 3月 4日



出願番号
Application Number:

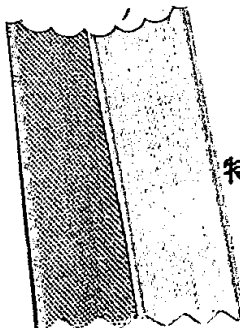
平成11年特許願第056379号

出願人
Applicant(s):

協和醗酵工業株式会社

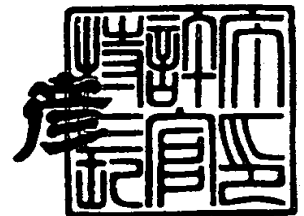
PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 4月 7日



特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3023230

【書類名】 特許願

【整理番号】 H10-1871Q3

【提出日】 平成11年 3月 4日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 39/00
C12P 21/08

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内

【氏名】 設楽 研也

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県川口市芝5374-18-601

【氏名】 澁谷 正史

【特許出願人】

【識別番号】 000001029

【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【代表者】 平田 正

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008187

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 白血病の診断薬および治療薬

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体を有効成分として含有する白血病の診断薬。

【請求項 2】 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 1 記載の診断薬。

【請求項 3】 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、KM1730、KM1731、KM1732、KM1748 および KM1750 からなる群より選ばれる抗体である請求項 1 記載の診断薬。

【請求項 4】 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、ヒト化抗体である請求項 1 記載の診断薬。

【請求項 5】 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体およびジスルフィド安定化 Fv からなる群より選ばれる抗体である請求項 1 記載の診断薬。

【請求項 6】 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に融合させた抗体である、請求項 1 記載の診断薬。

【請求項 7】 請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の抗体、該抗体断片、またはそれらの誘導体を有効成分として含有する白血病の診断薬。

【請求項 8】 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体を有効成分として含有する白血病の治療薬。

【請求項 9】 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 8 記載の治療薬。

【請求項 10】 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、KM1730、KM1731、KM1732、KM1748 および KM1750 からなる群より選ばれる抗体である請求項 8 記載の治療薬。

【請求項 11】 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、ヒト化抗体である請求項 8 記載の治療薬。

【請求項 12】 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体およびジスルフィド安定化 Fv からなる群より選ばれる抗体である請求項 8

記載の治療薬。

【請求項 13】 抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体が、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に融合させた抗体である、請求項 8 記載の治療薬。

【請求項 14】 請求項 8～13 のいずれか 1 項に記載の抗体、該抗体断片、またはそれらの誘導体を有効成分として含有する白血病の治療薬。

【請求項 15】 抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体を用いる、白血病の診断方法。

【請求項 16】 抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 15 記載の白血病の診断方法。

【請求項 17】 抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体が、KM1730、KM1731、KM1732、KM1748およびKM1750からなる群より選ばれる抗体である請求項 15 記載の白血病の診断方法。

【請求項 18】 抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体が、ヒト化抗体である請求項 15 記載の白血病の診断方法。

【請求項 19】 抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体およびジスルフィド安定化Fvからなる群より選ばれる抗体である請求項 15 記載の白血病の診断方法。

【請求項 20】 抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体が、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に融合させた抗体である、請求項 15 記載の白血病の診断方法。

【請求項 21】 請求項 15～20 のいずれか 1 項に記載の抗体、該抗体断片、またはそれらの誘導体を有効成分として含有する薬剤を用いた白血病の診断方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

【0002】

【従来の技術】

血管新生は、脊椎動物の胎生期における循環器系の形成や多くの組織の構築に

重要な役割を果たすとともに、成熟個体（雌）においても性周期における黄体形成、子宮内膜の一過性の増殖、胎盤形成などに密接に関与する。さらに、病的状態としては、固形腫瘍の増殖、転移形成、糖尿病性網膜症、慢性関節リュウマチの病態形成、促進に血管新生が深く関与している（J.Folkmanら；J. Biol. Chem., 267, 10931, 1992）。血管新生を誘導する因子としては、Vascular permeability factor (VPF)/Vascular endothelial growth factor (VEGF)が上記発生段階における血管新生および病的な状態における血管新生において最も重要な因子として知られている（M.Shibuya；Advances in Cancer Research Vol67, 281, 1995.）。

【0003】

血管新生を伴う疾患の中で、固形腫瘍の増殖、転移形成、糖尿病性網膜症、慢性関節リュウマチの病態形成にVEGFが深く関与していることが報告されている。固形腫瘍については、これまでに腎癌(A.Takahashiら；Cancer Research, 54, 4233, 1994)、乳癌(L.F.Brownら；Human Pathology, 26, 86, 1995)、脳腫瘍(R.A.Berkmanら；J. Clinical Investigation, 91, 153, 1993)、消化器癌(L.F.Brownら；Cancer Research, 53, 4727, 1993)、卵巣癌(T.A.Olsonら；Cancer Research, 54, 276, 1994)などの多くのヒト腫瘍組織においてVEGFが産生されていることが報告されている。

【0004】

ヒトのVEGF受容体としてはこれまでに受容体型チロシンキナーゼファミリーに属する第1の受容体であるFlt-1(fms-like tyrosine kinase)(M.Shibuyaら；Oncogene, 5, 519, 1990；C.Vriesら；Science, 255, 989, 1992.)および第2の受容体であるKDR(kinase insert domain-containing receptor) (B.I.Termanら；W092/14748, Priority Feb.22, 1991；B.I.Termanら；Biochem. Biophys. Res. Comm., 187, 1579, 1992)の2種が報告されている。ヒト型VEGF受容体KDRのマウス型ホモログはFlk-1(W.Matthewsら；Proc. Natl. Acad. Science, USA, 88, 9026, 1991；A.Ullichら；W094/11499 Priority Nov. 13, 1992；B.Millauerら；Cell, 72, 835, 1993.)と命名されている。Flt-1およびKDR/Flk-1の細胞外ドメインは7個のイムノグロブリン様ドメインよりなり、細胞内ドメインにはチロシンキナー

ゼドメインを有する分子量180～200キロダルトンの膜タンパクである。VEGFはFlt-1およびKDR/Flk-1にはそれぞれKD値が20 pMおよび75 pMで特異的に結合する。Flt-1およびKDR/Flk-1は血管内皮細胞に特異的に発現していると報告されている(T.P.Quinnら; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 7533, 1993; R.L.Kendallら; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8915, 1993)。Flt-1については、ヒト単球に発現し、細胞の遊走に関与することが報告されている(Blood, 87, 3336, 1996.)。

【0005】

Flt-1の様々な疾患における発現については、ヒトグリオブラストーマ組織の腫瘍血管内皮細胞[ネイチャー(Nature)359, 845(1992)]、ヒト消化器癌組織の腫瘍血管内皮細胞[キャンサー・リサーチ(Cancer Research), 53, 4727 (1993)]で、正常組織の血管内皮細胞に比べflt-1 mRNAの発現が上昇していることが報告されている。さらに、慢性関節リウマチ患者の関節の血管内皮細胞においてもイン・サイチュ・ハイブリダイゼーション(in situ hybridization)によりflt-1 mRNAの発現が認められることが報告されている[ザ・ジャーナル・オブ・エクスperimental・メディシン(J. Experimental Medicine), 180, 341, (1994)]。これらの結果は、腫瘍血管新生においてVEGF-VEGFレセプターFlt-1系が重要な役割を果たしていることを強く示唆するものである。Flt-1はVEGFが結合すること、細胞内ドメインが自己リン酸化されることが報告されているが[サイエンス(Science), 255, 989, (1992)]、詳しい機能については不明である。しかし、flt-1遺伝子を破壊したflt-1ノックアウトマウスは発生初期の血島形成や、それに続く血管新生において、血管内皮細胞の形態異常により血管構築が異常となり胎生8.5～9.5日齢で死亡することから、Flt-1は血管新生における血管内皮細胞の管腔形成に必須の機能を果たしていると推定されている[ネイチャー(Nature), 376, 66 (1995)]。

【0006】

以上のように、VEGFおよびVEGF受容体Flt-1は、固形腫瘍の増殖もしくは転移形成に関与することが報告されているが、白血病との関連についてはこれまで報告されていない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

造血系細胞が腫瘍化した疾患である白血病を診断および治療するための有用な方法が求められている。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、VEGF受容体Flt-1 に対する抗体が白血病細胞株に高率に反応することを初めて見出し、本発明を完成させた。即ち、本発明は以下の(1)～(28)に関する。

(1) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体を有効成分として含有する白血病の診断薬。

【0009】

(2) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする上記(1)記載の診断薬。

(3) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体が、KM1730、KM1731、KM1732、KM1748およびKM1750からなる群より選ばれる抗体である上記(1)記載の診断薬。

(4) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体が、ヒト化抗体である上記(1)記載の診断薬。

【0010】

(5) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体またはジスルフィド安定化Fvからなる群より選ばれる抗体である上記(1)記載の診断薬。

(6) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体が、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に融合させた抗体である上記(1)記載の診断薬。

【0011】

(7) 上記(1)～(6)のいずれか1項に記載の抗体、該抗体断片、またはそれらの誘導体を有効成分として含有する白血病の診断薬。

(8) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体を有効成分として含有する白血病の治療

薬。

(9) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする上記(8)記載の治療薬。

【0012】

(10) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体が、KM1730、KM1731、KM1732、KM1748およびKM1750からなる群より選ばれる抗体である上記(8)記載の治療薬。

(11) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体が、ヒト化抗体である上記(8)記載の治療薬。

(12) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体およびジスルフィド安定化Fvのいずれかであることを特徴とする上記(8)記載の治療薬。

【0013】

(13) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体が、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に融合させた抗体である、上記(8)記載の治療薬。

(14) 上記(8)～(13)のいずれか1項に記載の抗体、該抗体断片、またはそれらの誘導体を有効成分として含有する白血病の治療薬。

【0014】

(15) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体を用いる、白血病の診断方法。

(16) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする上記(15)記載の白血病の診断方法。

(17) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体が、KM1730、KM1731、KM1732、KM1748およびKM1750からなる群より選ばれる抗体である上記(15)記載の白血病の診断方法。

【0015】

(18) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体が、ヒト化抗体である上記(15)記載の白血病の診断方法。

(19) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体およびジスルフィド安定化Fvからなる群より選ばれる抗体である上記(15)記

載の白血病の診断方法。

【0016】

(20) 抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体が、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に融合させた抗体である、上記(15)記載の白血病の診断方法。

(21) 上記(15)～(20)のいずれか1項に記載の抗体、該抗体断片、またはそれらの誘導体を有効成分として含有する薬剤を用いた白血病の診断方法。

【0017】

【発明の実施の形態】

本発明で使用される抗体は、VEGF受容体Flt-1（以下、単にFlt-1と記す）に結合することができ、かつ白血病の診断あるいは治療効果を有するものであれば、いかなるものでもよい。本発明で使用される抗Flt-1抗体は、公知の手段「アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル、コールド・スプリングハーバー・ラボラトリー（Antibodies-A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, 1988）、以下、アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアルと記す」を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。

【0018】

本発明で使用される抗Flt-1抗体として、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体のいずれも用いることができるが、哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。

哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマにより産生される抗体、および、抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した形質転換体により生産される遺伝子組換え抗体をあげることができる。

【0019】

本発明で使用されるモノクローナル抗体は、ヒトVEGF受容体Flt-1に結合すればいかなるものでもよいが、以下に述べる製造法によって確立したものが好適なものとしてあげられる。

すなわち、ヒトVEGF受容体Flt-1タンパク質を抗原として調製し、該抗原を免疫した動物より抗原特異性をもつ形質細胞を誘導し、さらに、それと骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマを培養するか、あるいは該ハイブリドーマ細胞を動物に投与して該動物を腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより取得された、抗ヒトVEGF受容体Flt-1モノクローナル抗体をあげることができる。

【0020】

本発明で使用される遺伝子組換え抗体としては、上記本発明のモノクローナル抗体を遺伝子組換え技術を用いて改変したものであり、ヒト化抗体、抗体断片などをあげることができる。該抗体において、抗原性が低く、血中半減期の延長されたものは、治療薬として好ましい。

本発明で使用されるヒト化抗体は、ヒト型キメラ抗体およびヒト型CDR (Complementary Determining Region; 相補性決定領域 以下、CDRと記す) 移植抗体を包含する。

【0021】

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体可変領域重鎖 (以下、VHと称す) および可変領域軽鎖 (以下、VLと称す) とヒト抗体の定常領域重鎖 (以下、CHと称す) およびヒト抗体の定常領域軽鎖 (以下、CLと称す) とからなる抗体を意味する。

本発明で使用されるヒト型キメラ抗体は、ヒトVEGF受容体Flt-1に結合するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体CHおよびヒト抗体CLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ製造することができる。

【0022】

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト抗体に、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRをヒト以外の動物の抗体のCDR配列でそれぞれ置換した抗体を意味する。

本発明で使用されるヒト型CDR 移植抗体は、ヒトVEGF受容体Flt-1に結合する、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDR 配列で任意のヒト抗体のVHおよびVL

のCDR 配列をそれぞれ置換したV 領域をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCH およびヒト抗体のCLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型CDR 移植抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入し、発現させることにより製造することができる。

【0023】

本発明で使用されるヒト型キメラ抗体およびヒト型CDR 移植抗体のヒト抗体部分はいずれのイムノグロブリン(Ig)クラスに属するものでもよいがIgG 型のものが好適であり、IgG型に属するIgG1、IgG2、IgG3、IgG4等のイムノグロブリンのC 領域のいずれも用いることができる。

本発明で使用される抗体断片は、ヒトVEGF受容体Flt-1に対して結合性を示す抗体断片であるFab (Fragment of antigen bindingの略)、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体(single chain Fv; 以下、scFvと称す) およびジスルフィド安定化抗体(disulfide stabilized Fv; 以下、dsFvと称す)を含有する。

【0024】

Fabは、IgGのヒンジ領域で2本のH鎖を架橋している2つのジスルフィド結合の上部のペプチド部分を酵素パパイニンで分解して得られた、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体で構成された、分子量約5万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

本発明で使用されるFabは、抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体をパパイニン処理して得ることができる。または、該抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体のFab断片をコードするDNAを動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、Fabを製造することができる。

【0025】

Fab' は、上記F(ab')₂のヒンジ間のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

本発明で使用されるFab' は、抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体のFab'断片をコードするDNAを動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、Fab' を製造することができる。

【 0 0 2 6 】

$F(ab')_2$ は、IgGのヒンジ領域の2個のジスルフィド結合の下部を酵素トリプシンで分解して得られた、2つのFab領域がヒンジ部分で結合して構成された、分子量約10万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

本発明で使用される $F(ab')_2$ は、抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体をトリプシン処理して得ることができる。または、該抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体の $F(ab')_2$ 断片をコードするDNAを動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、 $F(ab')_2$ を製造することができる。

【 0 0 2 7 】

一本鎖抗体 (scFv) は、一本のVHと一本のVLとを適当なペプチドリンカー（以下、Lと称す）を用いて連結した、VH-L-VLないしはVL-L-VHポリペプチドを示す。本発明で使用されるscFvに含まれるVHおよびVLは、抗ヒトVEGF受容体Flt-1モノクローナル抗体あるいはヒト型CDR 移植抗体のいずれをも用いることができる。

【 0 0 2 8 】

本発明で使用される一本鎖抗体は、ヒトVEGF受容体Flt-1に結合する抗体を生産するハイブリドーマよりVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、一本鎖抗体発現ベクターを構築し、大腸菌、酵母、あるいは動物細胞へ導入することにより発現させ製造することができる。

ジスルフィド安定化抗体 (dsFv) は、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドをジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法【プロテイン・エンジニアリング (Protein Engineering) , 7, 697 (1994)】に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明で使用されるジスルフィド安定化抗体に含まれるVHあるいはVLはマウス型抗ヒトVEGF受容体Flt-1モノクローナル抗体あるいはヒト型CDR 移植抗体のいずれをも用いることができる。

【 0 0 2 9 】

本発明で使用されるジスルフィド安定化抗体は、ヒトVEGF受容体Flt-1に反応

する抗体を生産するハイブリドーマよりVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、適当な発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを大腸菌、酵母、あるいは動物細胞へ導入し発現させることにより製造することができる。

融合抗体は、上述の抗体に放射性同位元素、蛋白質、低分子の薬剤などを化学的あるいは遺伝子工学的に融合させたものをいう。

【0030】

本発明で使用する融合抗体は、ヒトVEGF受容体Flt-1に結合する抗体に放射性同位元素、蛋白質あるいは低分子の薬剤などを化学的に融合させることにより製造することができる。また、蛋白質との融合抗体については、抗体をコードするcDNAに蛋白質をコードするcDNAを連結させ、適当な発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを大腸菌、酵母、あるいは動物細胞に発現させることにより製造することができる。

【0031】

1. 抗ヒトVEGF受容体Flt-1モノクローナル抗体の作製方法

(1) 抗原の調製

抗ヒトVEGF受容体Flt-1モノクローナル抗体を作製するために必要な抗原としては、ヒトVEGF受容体Flt-1を細胞表面に発現した細胞あるいはその細胞膜画分、または、アミノ酸の長さの異なる細胞外領域を有する可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1蛋白質あるいは該蛋白質と抗体のFc部分との融合蛋白質などがあげられる。

【0032】

ヒトVEGF受容体Flt-1を細胞表面に発現する細胞としては、NIH3T3-Flt-1細胞 [セルグロース アンド ディファレンシエーション (Cell Growth & Differentiation) 7, 213, 1996.] があげられる。長さの異なる細胞外領域を有する可溶性ヒトVEGF受容体Flt-1蛋白質あるいは該蛋白質と抗体のFc部分との融合蛋白質として発現させる方法としては、ヒトVEGF受容体Flt-1をコードする全長あるいはその部分断片cDNA [セルグロース アンド ディファレンシエーション (Cell Growth & Differentiation) 7, 213, 1996.] を適当なベクターのプロモーター下流に挿入した組み換え体ベクターを造成し、それを宿主細胞に導入することにより得られたヒトVEGF受容体Flt-1発現細胞を、適当な培地中で培養することに

より細胞内あるいは培養上清中にヒトVEGF受容体Flt-1の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として生産することができる。また、上述の蛋白質の部分配列を有するポリペプチドをアミノ酸合成機を用いて合成することによっても調製することができる。

【0033】

宿主としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞など、目的とする遺伝子を発現できるものであれば、いずれでもよい。細菌としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*)、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 等のエシェリヒア属、バチルス属等の細菌が例示される。酵母としては、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) 等が例示される。動物細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ細胞、サル細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞等が例示される。昆虫細胞としては、Sf9、Sf21 (ファーマー・インジェン社製)、High Five (インビトロジェン社製) 等が例示される。

【0034】

本発明のDNAを導入するベクターとしては、該DNAを組み込むことができ、宿主細胞で発現できるものであればいかなるベクターでも用いることができる。

細菌、例えばエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) を宿主として用いる場合の発現ベクターとしては、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNA、転写終結配列、場合によってはプロモーターの制御配列より構成されているのが好ましいが、例えば、市販のpGEX (ファルマシア社製)、pET システム (ノバジェン社製) などが例示される。

【0035】

細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌にDNAを導入する方法であれば、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・U. S. A. (Proc. Natl. Acad. Sci., USA), 69, 2110-2114 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-248394) 等、いずれの方法も用いられる。

【0036】

酵母を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Y E p 1 3 (ATCC37115)、Y E p 2 4 (ATCC37051)、Y C p 5 0 (ATCC37419) 等が用いられる。

酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であれば、例えば、エレクトロポレーション法 [メソッズ・オブ・エンザイモロジー (Methods. Enzymol.), 194, 182-187 (1990)]、スフェロプラスト法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・U. S. A. (Proc. Natl. Acad. Sci., USA), 84, 1929-1933 (1978)]、酢酸リチウム法 [ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (J. Bacteriol.), 153, 163-168 (1983)] 等、いずれの方法も用いられる。

【0037】

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p A G E 1 0 7 [特開平3-22979 ; サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、p A G E 1 0 3 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.) 101, 1307 (1987)] 等が用いられる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいかなるものを用いてもよいが、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE(immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40あるいはメタロチオネインのプロモーター等があげられる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターとともに用いてもよい。

【0038】

動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であれば、例えば、エレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフエクション法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・U. S. A. (Proc. Natl. Acad. Sci., USA), 84, 7413 (1987)] 等、いずれの方法も用いられる。

【0039】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イ

ン・モレキュラー・バイオロジー、サプルメント1～34 (Current Protocols in Molecular Biology Supplement 1-34)、バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル (Baculovirus Expression Vectors A Laboratory Manual) 等に記載された方法によって、タンパク質を発現することができる。すなわち、以下に述べる組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得たのち、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質発現昆虫細胞を取得する。

【0040】

遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにインビトロジェン社製) 等が用いられる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレア・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) などが用いられる。

【0041】

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・U. S. A. (Proc. Natl. Acad. Sci., USA), 84, 7413 (1987)] 等が用いられる。

【0042】

また、ファーマンジェン社製バキュロゴールドスターターキットなどを用いて組み換えバキュロウイルスを作製したのち、前述したSf9、Sf21あるいはHigh Five等の昆虫細胞に該組み換えウイルスを感染させることにより蛋白質を生産させることもできる [バイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47(1988)]。

【0043】

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、分泌生産、融合蛋白質発現等が開発されており、いずれの方法も用いることができる。例えば、モレキュラー・クローニング 第2版、コールドスプリングハーバーラボラトリー・プレス [Mo

lecular Cloning 2nd edition, Cold Spring Harbor Lab. Press New York (1989); 以下、「モレキュラー・クローニング 第2版」と記す]に記載されている方法に準じて行うことができる。

【0044】

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、ヒトVEGF受容体Flt-1の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として製造することができる。

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

【0045】

大腸菌あるいは酵母等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい（モレキュラー・クローニング 第2版）。培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下、15～40℃で16～96時間行う。培養期間中、pHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。培養中は必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0046】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地、EagleのMEM培地またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、通常5%CO₂存在下、35～37℃で3～7日間行い、培養中は必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0047】

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地〔ファーミンジェン (Pharmlngen) 社製〕、Sf900IISFM〔ライフテクノロジーズ (Life Technologies) 社製〕、ExCell400、ExCell405

【いずれもJRH バイオサイエンシーズ (JRH Biosciences) 社製】等が用いられる。培養は、25～30℃で1～4日間行い、培養中は必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0048】

上記において、動物細胞および昆虫細胞の培養において可能であれば、ヒトVEGF受容体Flt-1の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質の精製を容易にするため、血清無添加の培地を用いることが好ましい。

ヒトVEGF受容体Flt-1の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として宿主細胞内に蓄積された場合には、培養終了後、細胞を遠心分離し、水系緩衝液にけん濁後、超音波法、フレンチプレス法などにより細胞を破碎し、その遠心分離上清に該蛋白質を回収する。

【0049】

さらに、細胞内に不溶体を形成した場合には、不溶体をタンパク質変性剤で可溶化後、タンパク質変性剤を含まないあるいはタンパク質変性剤の濃度がタンパク質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、タンパク質の立体構造を形成させることができる。

ヒトVEGF受容体Flt-1の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として細胞外に分泌された場合には、培養上清中に発現蛋白質を回収することができる。

【0050】

単離精製については、溶媒抽出、有機溶媒による分別沈殿、塩析、透析、遠心分離、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、結晶化、電気泳動などの分離操作を単独あるいは組み合わせて行うことができる。

【0051】

あるいは、部分配列を有するポリペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、桑和貿易（米国Advanced chemTech社製

）、パーキンエルマージャパン（米国Perkin-Elmer社製）、アロカ（米国Protein Technology Instrument社製）、クラボウ（米国Synthecell-Vega社製）、日本パーセプティブ・リミテッド（米国PerSeptive社製）、島津製作所等のペプチド合成機を用いても製造することができる。

【0052】

また、上述の蛋白質の部分配列を有するポリペプチドをアミノ酸合成機を用いて合成することによっても調製することができる。

【0053】

(2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

上記で得られた該蛋白質を抗原として動物を免疫する。免疫する方法としては、動物の皮下、静脈内または腹腔内に抗原をそのまま投与してもよいが、抗原性の高いキャリアタンパク質を抗原に結合させて投与する、あるいは適当なアジュバントとともに抗原を投与することが好ましい。

【0054】

キャリアタンパク質としては、スカシガイヘモシアニン、キーホールリンペットヘモシアニン、牛血清アルブミン、牛チログロブリン等があげられ、アジュバントとしては、フロインドの完全アジュバント(Complete Freund's Adjuvant)、水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチン等があげられる。

免疫動物としては、ウサギ、ヤギ、マウス、ラット、ハムスターなどの非ヒト哺乳動物があげられる。

【0055】

抗原の投与は、1回目の投与の後、1～2週間毎に3～10回行う。抗原の投与量は動物1匹当たり50～100 μ gが好ましい。各投与後、3～7日目に免疫動物の眼底静脈叢あるいは尾静脈より採血し、該血清の抗原との反応性について、酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法(ELISA法)：医学書院刊(1976年)〕などで確認する。

【0056】

そして、該血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物を、抗体産生細胞の供給源とする。

抗原の最終投与後3～7日目に、免疫動物より公知の方法（アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル）に準じてリンパ球を摘出し、リンパ球と骨髓腫細胞とを融合させる。

【0057】

ポリクローナル抗体は、該血清を分離、精製することにより調製することができる。

モノクローナル抗体は、該抗体産生細胞と非ヒト哺乳動物由来の骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマを培養するか、動物に投与して該細胞を腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより調製することができる。

抗体産生細胞は、抗原投与された非ヒト哺乳動物脾細胞、リンパ節、末梢血などから採取する。

【0058】

（3）骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞である、8-アザグアニン耐性マウス（BALB/c由来）骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1(P3-U1) [G.Kohlerら；ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・イムノロジー(Europ. J. Immunol.), 6, 511(1976)]、SP2/0-Ag14(SP-2) [M.Shulmanら；ネイチャー(Nature), 276, 269(1978)]、P3-X63-Ag8653(653) [J.F.Kearneyら；ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol.), 123, 1548(1979)]、P3-X63-Ag8(X63) [G.Kohlerら；ネイチャー(Nature), 256, 495(1975)] など、イン・ビトロ (in vitro) で増殖可能な骨髓腫細胞であればいかなるものでもよい。これらの細胞株の培養および継代については公知の方法（アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル）に従い、細胞融合時までに 2×10^7 個以上の細胞数を確保する。

【0059】

（4）細胞融合とモノクローナル抗体の選択

上記で得られた抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを洗浄したのち、ポリエチレングライコール-1000(PEG-1000)などの細胞凝集性媒体を加え、細胞を融合させ、培地中に懸濁させる。細胞の洗浄にはMEM培地またはPBS（リン酸二ナトリウ

ム1.83g、リン酸一カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水1 リットル、pH7.2) などを用いる。また、融合細胞を懸濁させる培地としては、目的の融合細胞のみを選択的に得られるように、HAT 培地〔正常培地〔RPMI-1640 培地にグルタミン(1.5mM)、2-メルカプトエタノール ($5 \times 10^{-5}M$)、ジェンタマイシン($10 \mu g/m$ l) および牛胎児血清(FCS) (CSL 社製、10%) を加えた培地〕にヒポキサンチン($10^{-4}M$)、チミジン ($1.5 \times 10^{-5}M$) およびアミノプテリン ($4 \times 10^{-7}M$) を加えた培地〕を用いる。

【0060】

培養後、培養上清の一部をとり、酵素免疫測定法により、抗原蛋白質に反応し、非抗原蛋白質に反応しないサンプルを選択する。ついで、限界希釈法によりクローニングを行い、酵素免疫測定法により安定して高い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

【0061】

酵素免疫測定法

抗原蛋白質あるいは抗原蛋白質を発現した細胞などをプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは上述の方法で得られる精製抗体を第一抗体として反応させる。

【0062】

第一抗体反応後、プレートを洗浄して第二抗体を添加する。

第二抗体とは、第一抗体を認識できる抗体に、ビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識したものである。具体的には、ハイブリドーマ作製の際にマウスを用いたのであれば、第二抗体としては、マウスイムノグロブリンを認識できる抗体を用いる。

【0063】

反応後、第二抗体を標識した物質に応じた反応を行い、抗原に特異的に反応するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

抗Flt-1モノクローナル抗体の具体例としては、W098/22616に記載されているハイブリドーマKM1732(FERM BP-5698)が生産するマウスIgG1サブクラスに属するモノクローナル抗体KM1732、ハイブリドーマKM1730(FERM BP-5697)が生産するマ

ウスIgG2bサブクラスに属するモノクローナル抗体KM1730、ハイブリドーマKM1731(FERM BP-5718)が生産するマウスIgG2aサブクラスに属するモノクローナル抗体KM1731、ハイブリドーマKM1748(FERM BP-5699)が生産するマウスIgG2bサブクラスに属するモノクローナル抗体KM1748、および、ハイブリドーマKM1750(FERM BP-5700)が生産するマウスIgG2bサブクラスに属するモノクローナル抗体KM1750などがあげられる。

【0064】

(5) モノクローナル抗体の調製

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞を培養して得られる培養液、またはプリスタン処理〔2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン(Pristane)0.5mlを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8～10週令のマウスまたはヌードマウスに、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を腹腔内投与して腹水癌化させた腹水から、分離、精製することにより調製できる。

【0065】

モノクローナル抗体を分離、精製する方法としては、遠心分離、40～50% 飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿法、DEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて行う方法があげられる。この方法により、IgG あるいはIgM 画分を回収し、精製モノクローナル抗体を取得することができる。

【0066】

精製モノクローナル抗体のサブクラスの決定は、モノクローナル抗体タイピングキットなどを用いて行うことができる。蛋白質量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出することができる。

抗体のサブクラスとは、クラス内のアイソタイプのことで、マウスでは、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、ヒトでは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4があげられるが、特にマウスIgG1、IgG2a、ヒトIgG1タイプは、補体依存性細胞傷害活性（以下、CDC 活性）および抗体依存性細胞傷害活性（以下、ADCC活性）を有し、治療への応用上、有用である。

【0067】

2. 組換え抗体の作製方法 (1) - 抗ヒトVEGF受容体Flt-1 ヒト化抗体の作製方法

(1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト以外の動物の抗体からヒト化抗体を作製するために必要なヒト化抗体発現用ベクターを構築する。ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体のC領域であるCHおよびCLをコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子をそれぞれ挿入することにより構築されたものである。

【0068】

ヒト抗体のC領域としては、例えば、ヒト抗体H鎖ではC γ 1やC γ 4、ヒト抗体L鎖ではC κ 等の任意のヒト抗体のC領域を用いることができる。ヒト抗体のC領域をコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンより成る染色体DNAを用いることができ、また、cDNAを用いることもできる。動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体C領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。

【0069】

例えば、pAGE107 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J.Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [ジーン(Gene), 27, 223 (1984)]、pKCR [プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc.Natl.Acad.Sci.), 78, 1527 (1981)]、pSG1 β d2-4 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 4, 173 (1990)]等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の初期プロモーターとエンハンサー [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J.Biochem.), 101, 1307 (1987)]、モロニー Maus 白血病ウイルスのLTR プロモーターとエンハンサー [バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochem.Biophys.Res.Comun.), 149, 960 (1987)]、および免疫グロブリンH鎖のプロモーター [セル(Cell), 41, 479 (1985)] とエンハンサー [セル(Cell), 33, 717 (1983)]等があげ

られる。

【0070】

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体H鎖、L鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ（タンデム型）のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築のしやすさ、動物細胞への導入のし易さ、動物細胞内での抗体H鎖およびL鎖の発現量のバランスがとれる等の点でタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ (J.Immunol.Methods) , 167, 271(1994)] 。

【0071】

(2) ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAの取得

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗ヒトVEGF受容体Flt-1モノクローナル抗体のVHおよびVLをコードするcDNAは以下のようにして取得する。

抗ヒトVEGF受容体Flt-1モノクローナル抗体を産生する細胞、例えば、マウスヒトVEGF受容体Flt-1抗体産生ハイブリドーマ等よりmRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAを、ファージあるいはプラスミドなどのベクターに挿入し、cDNAライブラリーを作製する。該ライブラリーより、ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体のC領域部分あるいはV領域部分をプローブとして用い、VHをコードするcDNAを有する組換えファージあるいは組換えプラスミド、およびVLをコードするcDNAを有する組換えファージあるいは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージあるいは組換えプラスミド上の目的とする抗体のVHおよびVLの全塩基配列を決定し、塩基配列よりVHおよびVLの全アミノ酸配列を推定する。

【0072】

(3) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

前記2(1)で構築したヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子の上流に、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを挿入し、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、キメラ抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子の上流にあらかじめヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAをクローニング

するための制限酵素の認識配列を設けておき、このクローニングサイトにヒト以外の動物の抗体のV領域をコードするcDNAを下記に述べる合成DNAを介して挿入することにより、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを製造することができる。合成DNAは、ヒト以外の動物の抗体のV領域の3'末端側の塩基配列とヒト抗体のC領域の5'末端側の塩基配列とからなるものであり、両端に適当な制限酵素部位を有するようにDNA合成機を用いて製造する。

【0073】

(4) ヒト以外の動物の抗体のCDR 配列の同定

抗体の抗原結合部位を形成するVH及びVLは、配列の比較的保存された4個のフレームワーク領域（以下、FR領域と称す）とそれらを連結する配列の変化に富んだ3個の相補性決定領域（CDR）から成っている【シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991】。そして各CDR アミノ酸配列（CDR 配列）は、既知の抗体のV領域のアミノ酸配列【シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991】と比較することにより同定することができる。

【0074】

(5) ヒト型CDR 移植抗体のV領域をコードするcDNAの構築

ヒト型CDR 移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAは以下のようにして取得することができる。

まず、目的のヒト以外の動物の抗体のV領域のCDR を移植するためのヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列をVH、VLそれぞれについて選択する。ヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のV領域のFRのアミノ酸配列であればいかなるものでも用いることができる。

【0075】

例えば、Protein Data Bank に登録されているヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列、ヒト抗体のV領域のFRの各サブグループの共通アミノ酸配列【シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of

Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] があげられるが、十分な活性を有するヒト型CDR 移植抗体を創製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体のV領域のアミノ酸配列と高い相同性、好ましくは65%以上の相同性を有することが望ましい。次に、選択したヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列をコードするDNA 配列と目的のヒト以外の動物の抗体のV領域のCDR のアミノ酸配列をコードするDNA配列を連結させて、VH、VLそれぞれのアミノ酸配列をコードするDNA 配列を設計する。CDR移植抗体可変領域遺伝子を構築するために設計したDNA 配列を得るためには、全DNA配列をカバーするように各鎖について数本の合成DNAを設計し、それらを用いてポリメラーゼ・チェーン・リアクション (Polymerase Chain Reaction; 以下、PCRと記す) を行う。PCR での反応効率および合成可能なDNA の長さから各鎖について、好ましくは、6本の合成DNA を設計する。反応後、増幅断片を適当なベクターにサブクローニングし、その塩基配列を決定し、目的のヒト型CDR 移植抗体の各鎖のV 領域のアミノ酸配列をコードするcDNAを含むプラスミドを取得する。また、約100塩基よりなる合成DNAを用いてセンス、アンチセンスともに全配列を合成し、それらを実行、連結することで、目的のヒト型CDR 移植抗体の各鎖のV 領域のアミノ酸配列をコードするcDNAを構築することもできる。

【0076】

(6) ヒト型CDR 移植抗体のV 領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型CDR 移植抗体は目的のヒト以外の動物の抗体のV 領域のCDR のみをヒト抗体のV 領域のFR間に、単純に移植しただけでは、その活性はもとのヒト以外の動物の抗体の活性に比べて低下してしまうことが知られている [バイオテクノロジー (BIO/TECHNOLOGY) , 9, 266 (1991)]。そこでヒト抗体のV 領域のFRのアミノ酸配列のうち、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基、CDRのアミノ酸残基と相互作用をしているアミノ酸残基、あるいは抗体の立体構造の維持に関与している等の可能性を有するアミノ酸残基をもとのヒト以外の動物の抗体に見出されるアミノ酸残基に改変し、活性を上昇させることが行われている。そして、それらのアミノ酸残基を効率よく同定するため、X線結晶解析あるいはコンピューターモデリング等を用いた抗体の立体構造の構築および解析を行っている

。しかし、いかなる抗体にも適応可能なヒト型CDR移植抗体の製造法は未だ確立されておらず、現状では個々の抗体によって種々の試行錯誤が必要である。

【0077】

選択したヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列の改変は各種の変異導入プライマーを用いて前記2(5)に記載のPCRを行うことにより達成できる。PCR後の増幅断片を適当なベクターにサブクローニング後、その塩基配列を決定し、目的の変異が導入されたcDNAを含むベクター（以下、アミノ酸配列改変ベクターと称す）を取得する。

【0078】

また、狭い領域のアミノ酸配列の改変であれば、20～35塩基からなる変異導入プライマーを用いたPCR変異導入法により行うことができる。具体的には、改変後のアミノ酸残基をコードするDNA配列を含む20～35塩基からなるセンス変異プライマー及びアンチセンス変異プライマーを合成し、改変すべきV領域のアミノ酸配列をコードするcDNAを含むプラスミドを鋳型として2段階のPCRを行う。最終増幅断片を適当なベクターにサブクローニング後、その塩基配列を決定し、目的の変異が導入されたcDNAを含むアミノ酸配列改変ベクターを取得する。

【0079】

(7) ヒト型CDR移植抗体発現ベクターの構築

前記2(1)のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCH及びCLをコードする遺伝子の上流に、前記2(5)および2(6)で取得したヒト型CDR移植抗体のVH及びVLをコードするcDNAを挿入し、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト型CDR移植抗体のVH及びVLのアミノ酸配列をコードするcDNAを構築するためのPCRの際に5'末端および3'末端の合成DNAの末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、所望のヒト抗体のC領域をコードする遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現するように挿入することができる。

【0080】

(8) ヒト化抗体の一過性（トランジェント）発現および活性評価

多種類のヒト化抗体の活性を効率的に評価するために、前記2(3)のヒト型キメラ抗体発現ベクター、および前記2(7)のヒト型CDR移植抗体発現ベクタ

ーあるいはそれらの改変ベクターをCOS-7細胞（ATCC CRL1651）に導入してヒト化抗体の一過性発現〔メソツズ・イン・ヌクレイック・アシッド・リサーチ（Methods in Nucleic Acids Res.）, CRC Press, p.283, 1991〕を行い、その活性を測定することができる。

【0081】

COS-7細胞への発現ベクターの導入法としては、DEAE-デキストラン法〔メソツズ・イン・ヌクレイック・アシッド・リサーチ（Methods in Nucleic Acids Res.）, CRC Press, p.283, 1991〕、リポフェクション法〔プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス〔Proc. Natl. Acad. Sci., 84, 7413（1987）〕等があげられる。

ベクターの導入後、培養上清中のヒト化抗体の活性は前記1（5）に記載の酵素免疫測定法（ELISA法）等により測定することができる。

【0082】

（9）ヒト化抗体の安定（ステーブル）発現および活性評価

前記2（3）のヒト型キメラ抗体発現ベクターおよび前記2（7）のヒト型CDR移植抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することによりヒト化抗体を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

【0083】

宿主細胞への発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法〔特開平2-257891、サイトテクノロジー（Cytotechnology）, 3, 133（1990）〕等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、マウスSP2/0-Ag14細胞（ATCC CRL1581）、マウスP3X63-Ag8.653細胞（ATCC CRL1580）、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（以下、DHFR遺伝子と称す）が欠損したCHO細胞〔プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Proc. Natl. Acad. Sci.）, 77, 4216（1980）〕、ラットYB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞（ATCC CRL1662、以下、YB2/0細胞と称す）等があげられる。

【0084】

ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、G418およびFCSを含むRPMI1640培地により選択する。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養液中にヒト化抗体を生産蓄積させることができる。培養液中のヒト化抗体の活性は前記1(5)に記載の方法などにより測定する。また、形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、DHFR遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる。

【0085】

ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテインA カラムを用いて精製することができる[アンチボディズ (Antibodies), A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 8, 1988 ; 以下、「アンチボディズ」と記す]。また、その他に、通常の蛋白質で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過等を組合せて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体のH鎖、L鎖あるいは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) [ネイチャー (Nature), 227, 680 (1970)] やウエスタンブロッティング法 (アンチボディズ, Chapter 12, 1988) 等で測定する。

【0086】

精製したヒト化抗体の反応性、また、ヒト化抗体のVEGFに対する阻害活性の測定は前記1(4)に記載の方法などにより測定することができる。

【0087】

3. 組換え抗体の作製方法 (2)

(1) 抗体断片Fab、Fab'、F(ab')の作製方法

上述した抗体を酵素で処理することにより、抗体断片を生成させる。酵素としては、パパイン、トリプシンなどをあげることができる。

または、該抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体のFab、Fab'あるいはF(ab')断片をコードするDNAを動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、Fab、Fab'あるいはF(ab')を製造することができる。

【0088】

生成される抗体断片は、ゲル濾過、イオン交換、アフィニティークロマトグラフィーおよび限外濾過等を組み合わせて行い、生成することができる。精製した Fab、Fab'、F(ab') 分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) [ネイチャー (Nature), 227, 680 (1970)] やウエスタンブロッティング法 (アンチボディズ, Chapter 12, 1988) 等で測定する。

精製した Fab、Fab'、F(ab') の反応性、また、Fab、Fab'、F(ab') の VEGF に対する阻害活性の測定は前記 1 (4) に記載の方法などにより測定することができる。

【0089】

(2) 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 一本鎖抗体の作製方法

前記 2 (2)、2 (5) および 2 (6) に記載のヒト以外の動物の抗体あるいはヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA を一本鎖抗体発現用ベクターに挿入することによりヒト以外の動物の抗体の一本鎖抗体あるいはヒト型 CDR 移植抗体の一本鎖抗体の発現ベクターを構築することができる。ここで用いる一本鎖抗体発現用ベクターとしてはヒト以外の動物の抗体あるいはヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA を組み込み発現できるものであれば、いかなるものでも用いることができる。

【0090】

例えば、pAGE107 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [ジーン (Gene), 27, 223 (1984)]、pKCR [プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.), 78, 1527 (1981)]、pSG1 β d2-4 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 4, 173 (1990)] 等があげられる。一本鎖抗体を発現させるための宿主としては、大腸菌、酵母、動物細胞等の中から適切なものを選択することができるが、その場合の発現用ベクターとしては、それぞれの宿主に適切なものを選択する必要がある。また、適切なシグナルペプチドをコードする cDNA を発現用ベクターに挿入することで一本鎖抗体を細胞外に分泌させ、ペリプラズマ領域に輸送させ、あるいは細胞内に留まらせることができる。

【0091】

選択された発現用ベクターに、VH-L-VLあるいはVL-L-VH（Lはペプチドリンカー）からなる一本鎖抗体をコードするcDNAを適切なプロモーター、シグナルペプチドの下流に挿入することにより、目的の一本鎖抗体をコードするcDNAが挿入された一本鎖抗体発現ベクターを構築することができる。

一本鎖抗体をコードするcDNAは、VHをコードするcDNAとVLをコードするcDNAとを、両端に適当な制限酵素の認識配列を有するペプチドリンカーをコードする合成DNAを用いて連結することにより得ることができる。リンカーペプチドは、その付加がVH、VLの抗原への結合に対して妨害しないように最適化することが重要で、例えばPantolianoらにより示されたもの〔バイオケミストリー（Biochemistry），30，10117（1991）〕あるいはそれを改変したものを用いることができる。

【0092】

（3）抗ヒトVEGF受容体Flt-1ジスルフィド安定化抗体の作製方法

ジスルフィド安定化抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAあるいはヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAのそれぞれの適切な位置の1アミノ酸残基に相当するDNA配列をシステイン残基に相当するDNA配列に改変し、発現および精製したのち、ジスルフィド結合を形成させることで作製することができる。アミノ酸残基のシステイン残基への改変は前記2（5）のPCRを用いた変異導入法により行うことができる。

【0093】

得られた改変VHおよび改変VLをコードするcDNAを適切な発現用ベクターに挿入することによりジスルフィド安定化抗体H鎖発現ベクターおよびジスルフィド安定化抗体L鎖発現ベクターを構築することができる。ここで用いるジスルフィド安定化抗体発現用ベクターとしては改変VHおよび改変VLをコードするcDNAを組み込み発現できるものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、PAGE107〔サイトテクノロジー（Cytotechnology），3，133（1990）〕、PAGE103〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（J.Biochem.），101，1307（1987）〕、PHSG274〔ジーン（Gene），27，223（1984）〕、pKCR〔プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Proc.Natl.Acad.Sci.），78，1527（1

981)]、pSG1 β d2-4 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 4, 173 (1990)] 等があげられる。ジスルフィド安定化抗体を形成させるためにジスルフィド安定化抗体L鎖発現ベクターおよびジスルフィド安定化抗体H鎖発現ベクターを発現させるための宿主としては、大腸菌、酵母、動物細胞等の中から適切なものを選択することができるが、その場合の発現用ベクターとしては、それぞれの宿主に適切なものを選択する必要がある。

また、適切なシグナルペプチドをコードするcDNAを発現用ベクターに挿入することでジスルフィド安定化抗体を細胞外に分泌させ、ペリプラズマ領域に輸送させ、あるいは細胞内に留まらせることができる。

【0094】

(4) 各種抗体の発現および活性評価

前記(1)～(3)で構築された抗体断片発現ベクター、一本鎖抗体発現ベクター、ジスルフィド安定化抗体H鎖発現ベクターあるいはジスルフィド安定化抗体L鎖発現ベクターをエレクトロポレーション法 [特開平2-257891、サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] 等の方法により宿主細胞へ導入することにより、目的の抗体断片発現ベクター、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖を生産する形質転換株を取得することができる。発現ベクターの導入後、培養上清等に含まれる抗体断片発現ベクター、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖の発現は前記1(4)に記載の方法等により確認することができる。

【0095】

一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖の回収および精製は公知の技術を組み合わせることにより達成することができる。例えば、抗体断片発現ベクター、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖が培地中に分泌されるならば、限外濾過により濃縮することができ、次いで各種クロマトグラフィーあるいはゲル濾過を実行することにより達成することができる。また、宿主細胞のペリプラズマ領域へと輸送されるならば、その細胞に浸透圧ショックを与え、限外濾過により濃縮することができ、次いで各種クロマトグラフィーあるいはゲル濾過を実行すること

により達成することができる。不溶性であり、かつ顆粒（インクルージョン・ボディー）として存在している抗体断片発現ベクター、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖は、細胞の溶解、顆粒を単離するための遠心分離と洗浄の繰り返し、例えばグアニジン-塩酸による可溶化後、各種クロマトグラフィーあるいはゲル濾過を実行することにより達成することができる。

【0096】

精製された一本鎖抗体は、前記1（4）に記載の方法等により測定することができる。

精製されたジスルフィド安定化抗体H鎖とジスルフィド安定化抗体L鎖は、各々を混合したのち、活性を有する構造へと導く操作 [refolding 操作, モレキュラー・イムノロジー (Molecular Immunology), 32, 249 (1995)] によりジスルフィド結合を形成させた後、抗原アフィニティークロマトグラフィーもしくはイオン交換クロマトグラフィーまたはゲルろ過により活性を有するジスルフィド安定化抗体を精製することができる。ジスルフィド安定化抗体の活性は前記1（4）に記載の方法等により測定することができる。

【0097】

4. 融合抗体の作製方法

本発明で使用される抗体あるいは該抗体断片に、放射性同位元素、蛋白質、低分子の薬剤などを、化学的あるいは遺伝子工学的に融合させた融合抗体も抗体の誘導体として使用することができる。抗体と毒素蛋白とを化学的に融合させた融合抗体は例えばAnticancer Research, 11, 2003, 1991; Nature Medicine, 3, 350, 1996に従って作製することができる。抗体と毒素、サイトカイン等の蛋白質とを遺伝子工学的に融合させた融合抗体は例えばProceeding of National Academy of Science USA, 93, 974, 1996, Proceeding of National Academy of Science USA, 93, 7826, 1996に従って作製することができる。抗体と低分子抗癌剤を化学的に融合させた融合抗体は例えばScience, 261, 212, 1993に従って作製することができる。抗体と放射性同位元素を化学的に融合させた融合抗体は例えばAntibody Immunoconjugates and Radiopharmaceutica

ls), 3, 60, 1990; Anticancer Research, 11, 2003, 1991に従って作製することができる。

【0098】

これらの誘導体は、抗体分子の特異性に従って放射性同位元素、蛋白質（サイトカイン、トキシン、酵素など）、低分子の薬剤などを標的組織周辺に集積させることで、より効果的で副作用の少ない診断あるいは治療を可能にすることが期待されている。

【0099】

5. 抗体の使用法

上述した抗Flt-1抗体、該抗体断片あるいはそれらと他分子との融合抗体は、ヒトVEGF受容体Flt-1と結合し、ADCC、CDC等の抗体のエフェクター活性を介してFlt-1発現細胞を破壊するため、白血病の治療等に有用であると考えられる。

【0100】

本発明の抗体を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

【0101】

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類

、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

【0102】

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

【0103】

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該化合物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製する。

【0104】

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該化合物および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg} \sim 8\text{mg}/\text{kg}$ である。

【0105】

本発明で示したVEGF受容体Flt-1に対するモノクローナル抗体は、白血病細胞に高率に反応することから、白血病の診断薬あるいは治療薬に用いることができる。

また、本発明で使用する抗体の白血病細胞に対する抗腫瘍効果を検討する方法は、インビトロ実験としては、補体依存性細胞障害活性（CDC活性）測定法、抗体依存性細胞障害活性（ADCC活性）測定法等があげられ、インビボ実験としては、マウス等の実験動物での腫瘍系を用いた抗腫瘍実験等があげられる。

【0106】

CDC活性、ADCC活性、抗腫瘍実験は、Cancer Immunology Immunotherapy, 36, 373, 1993., Cancer Research, 54, 1511, 1994. 等記載の方法に従い行うことができる。

【0107】

6. 白血病の診断方法

白血病の診断方法として、被験者の細胞あるいは組織に存在するヒトVEGF受容体Flt-1を下記の述べる免疫学的に検出または定量する方法があげられる。

VEGF受容体Flt-1に対する抗体を用いて白血病細胞を免疫学的に検出する方法としては、蛍光抗体法、免疫酵素抗体法（ELISA）、放射性物質標識免疫抗体法（RIA）、免疫組織染色法、免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法（ABC法、CSA法等）、ウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、上記に記した酵素免疫測定法、サンドイッチELISA 法 [単クローン抗体実験マニュアル（講談社サイエンティフィック、1987年）、続生化学実験講座 5 免疫生化学研究法（東京化学同人、1986年）] などを用いることができる。

【0108】

蛍光抗体法は、Monoclonal Antibodies: Principles and practice Third edition (Academic Press, 1996年)、単クローン抗体実験マニュアル（講談社サイエンティフィック、1987年）等に記載された方法を用いて行うことができる。具体的には、分離した細胞あるいは組織などに、本発明のモノクローナル抗体を反応させ、さらにフルオレシニン・イソチオシアネート（FITC）あるいはフィコエリスリンなどの蛍光物質でラベルした抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定する方法である。

【0109】

免疫細胞染色法、免疫組織染色法などの免疫組織化学染色法（ABC法、CSA法等

) は、Monoclonal Antibodies: Principles and practice Third edition (Academic Press, 1996年)、単クローン抗体実験マニュアル (講談社サイエンティフィック、1987年) 等に記載された方法を用いて行うことができる。

免疫酵素抗体法 (ELISA) は、分離した、細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明の抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識などを施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定する方法である。

【0110】

放射性物質標識免疫抗体法 (RIA) は、分離した、細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明の抗体を反応させ、さらに放射線標識を施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、シンチレーションカウンタなどで測定する方法である。

【0111】

免疫細胞染色法、免疫組織染色法は、分離した、細胞あるいは組織などに、本発明の抗体を反応させ、さらにフルオレシニン・イソチオシアネート (FITC) などの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法である。

【0112】

本発明は抗体を用いることを特徴とする、白血病の診断方法あるいは治療方法、本発明の抗体を有効成分とする、白血病の診断薬あるいは治療薬に関する。

【0113】

【実施例】

実施例 1 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体の製造法

抗 Flt-1 モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ KM1732 (FERM BP-5698)、ハイブリドーマ KM1730 (FERM BP-5697)、ハイブリドーマ KM1731 (FERM BP-5718)、ハイブリドーマ KM1748 (FERM BP-5699)、および、KM1750 (FERM BP-5700) をそ

れぞれ $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹をプリスタン処理した8週令ヌード雌マウス (Balb/c) の腹腔内に注射した。10~21日後に、ハイブリドーマは腹水癌化した。腹水のたまったマウスから、腹水を採取 (1~8ml/匹) し、遠心分離 (3,000rpm、5分間) して固形分を除去した後カプリル酸沈殿法 (アンチボディース・ア・ラボラトリー・マニュアル) により精製し、精製モノクローナル抗体とした。

【0114】

モノクローナル抗体の抗体クラスはサブクラスタイピングキット [ザイメット (Zymed) 社製] を用いた酵素免疫測定法を行った。その結果、KM1732はマウスIgG1サブクラス、KM1730(FERM BP-5697)はマウスIgG1サブクラス、KM1731(FERM BP-5718)はマウスIgG2aサブクラス、KM1748(FERM BP-5699)はマウスIgG2bサブクラス、および、KM1750(FERM BP-5700)はマウスIgG2bサブクラスに属するモノクローナルであった。

【0115】

実施例2 抗ヒトFlt-1モノクローナル抗体のヒト癌細胞株との反応性の確認

ヒト由来癌細胞株としては、肺小細胞癌SBC-3 (Cancer Research, 54, 1511, 1994.)、SBC-5 (Cancer Research, 54, 1511, 1994.)、肺扁平上皮癌Calu-1 (Cancer Research, 54, 1511, 1994.)、PC-10 (Cancer Research, 54, 1511, 1994.)、肺腺癌PC-7 (Cancer Research, 54, 1511, 1994.)、HLC-1 (Cancer Research, 54, 1511, 1994.)、大腸癌Colo205 (ATCC CCL-222)、子宮癌Hela (ATCC CCL-2)、卵巣癌MCAS (ヒューマンサイエンス資源財団JCRB 0240)、OVCAR-3 (大日本製薬より購入)、胃癌MKN-1 (Cancer Research, 46, 4438, 1986)、KatoIII (Cancer Research, 46, 4438, 1986)、乳癌R27 (Anticancer Research, 12, 1121, 1992)、MCF7 (ATCC HTB-22)、膀胱癌HPAF-2 (ATCC CRL-1997)、BXPC-3 (ATCC CRL-1687)、Capan-1 (ATCC HTB-79)、Capan-2 (ATCC HTB-80)、メラノーマG361 (ATCC CRL-1424)、Sk-Mel-28 (ATCC HTB-72)、神経芽細胞腫NAGAI (Cancer Research, 54, 1511, 1994.)、YT-nu (Cancer Research, 54, 1511, 1994.)、グリオブラストーマA172 (ATCC CRL-1620)、T98G (ATCC CRL-1690)、白血病Jurkat (ATCC TIB-152)、U-937 (ATCC CRL-1593)、HL-60 (ATCC CRL-240)、H SB-2 (ATCC CCL-120.1)、TALL-1 (Cancer Research, 54, 1511, 1994.)、KOPN-

K (Cancer Research, 54, 1511, 1994.), NALL-1 (Cancer Research, 54, 1511, 1994.), HEL92.1.7 (ATCC TIB-180), HPB-ALL (Cancer Research, 54, 1511, 1994.), K562 (ATCC CCL-243), CCRF-CEM (ATCC CCL-119), CCRF-SB (ATCC CC 1-120) を用いた。また、正常細胞としてヒトさい帯静脈由来の血管内皮細胞 (H UVEC) (Clonetics社より購入) を用いた。

【0116】

実施例 1 で述べた抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体のヒト癌細胞株に対する反応性を免疫細胞染色法を用いて以下の手順に従い確認した。

抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1730 および KM1732、ならびにコントロール抗体として、マウス IgG1 クラスに属し、かつヒト VEGF 受容体 Flt-1 には反応せず、ヒト MxA 蛋白質に反応するマウスモノクローナル抗体 KM1135 (W096/05230) を、常法に従いビオチン化標識した。

【0117】

各細胞株 2×10^5 個を丸底 96 ウェルプレートに免疫細胞染色用緩衝液 (1% BSA, 0.02% EDTA, 0.05% アジ化ナトリウムを含む PBS) $100 \mu\text{l}$ に懸濁して分注した。4℃、 $350 \times g$ で 1 分間遠心分離後、上清を除き、ビオチン化標識 KM1730 抗体、ビオチン化標識 KM1732 抗体またはビオチン化標識 KM1135 コントロール抗体をそれぞれ該ウェルに $50 \mu\text{l}$ ($10 \mu\text{g/ml}$) を添加し、4℃ で 30 分間反応させた。反応後、 $200 \mu\text{l}$ の免疫細胞染色用緩衝液を各ウェルに加え 4℃、 $350 \times g$ で 1 分間遠心分離後、上清を除き細胞の洗浄を行った。この洗浄操作をさらに 2 回行った後、Avidin-PE (Streptoavidin-R-Phycoerythrin) (Gibco 社製) を $5 \mu\text{g/ml}$ の濃度を含む免疫細胞染色用緩衝液 $20 \mu\text{l}$ を加えて 4℃ で 30 分間反応させた。反応後、上記と同様の洗浄操作を 3 回行った後、フローサイトメーター (コールター社製) を用いて解析を行った。

【0118】

【表 1】

第 1 表

反応性			反応性		
抗Flt-1モノクローナル抗体			抗Flt-1モノクローナル抗体		
ターゲット細胞	KM1730	KM1732	ターゲット細胞	KM1730	KM1732
肺小細胞癌	-	-	メラノーマ	-	-
SBC-3	-	-	G361	-	-
SBC-5	-	-	Sk-Mel-28	-	-
肺扁平上皮癌	-	-	神経芽細胞腫	-	-
Caki-1	-	-	NAGAI	-	-
PC-10	-	-	YT-nu	-	-
肺癌	-	-	グリオブラストーマ	-	-
PC-7	-	-	A172	-	-
HLC-1	-	-	T98G	-	-
大腸癌	-	-	白血病	-	-
Colo205	-	-	Jurkat (T)	++	++
子宮癌	-	-	U-937 (Monocyte)	-	-
Hela	-	-	HL-60 (Promyelo)	-	-
卵巣癌	-	-	HSB-2 (T)	++	++
MCAS	-	-	TALL-1 (T)	-	-
OVCAR-3	-	-	KOPN-K (Null)	+	+
胃癌	-	-	NALL-1 (Null)	-	-
MKN-1	-	-	HEL92.1.7 (Erythro)	-	-
KatoIII	-	-	HPB-ALL (T)	-	-
乳癌	-	-	K562 (Myelo)	-	-
R27	-	-	CCRF-CEM (T)	+	+
MCF7	-	-	CCRF-SB (B)	-	-
肺癌	-	-	正常血管内皮細胞	+	+
HPAF-2	-	-	HUVEC	-	-
BXPC-3	-	-			
Capen-1	-	-			
Capen-2	-	-			

【0119】

結果を図1および第1表に示す。

図1に示したように抗ヒトVEGF受容体Flt-1モノクローナル抗体KM1730およびKM1732は、KM1135コントロール抗体に比べて、ヒトVEGF受容体を発現しているHUV EC-5620細胞に反応した。白血病細胞であるKOPN-K、CCRE-CEM、HSB-2、JURKATについても、抗ヒトVEGF受容体Flt-1モノクローナル抗体KM1730およびKM1732は、KM1135コントロール抗体に比べ反応した。一方、抗ヒトVEGF受容体Flt-1モノクローナル抗体KM1730およびKM1732は、G361細胞、CAPAN-1細胞には全く反応しなかった。

【0 1 2 0】

第1表には、同様にして検討した計41種類の細胞株の解析結果をまとめた。12種類の白血病細胞については、4種の細胞株Jurkat、HSB-2、KOPN-K、CCRF-CEMにKM1730およびKM1732が反応した。KOPN-K、CCRF-CEMについてはHUVECと同等の反応性を示し、Jurkat、HSB-2についてはHUVEC以上の高い反応性を示した。反応した4種の白血病細胞のうち3種（Jurkat、HSB-2、CCRF-CEM）はT細胞系の白血病であり、1種（KOPN-K）は非T細胞非B細胞系の白血病であった。T細胞系白血病については5種類検討したうち3種類と高率に反応した。一方、上皮細胞由来の腫瘍である肺腺癌、肺扁平上皮癌、大腸癌、子宮癌、卵巣癌、胃癌、乳癌、膀胱癌、および、神経外胚葉系由来腫瘍である肺小細胞癌、メラノーマ、神経芽細胞腫、グリオブラストーマについては計24種の癌細胞株を検討したが、抗VEGF受容体Flt-1モノクローナル抗体KM1730、KM1732は全く反応しなかった。

【0 1 2 1】

【発明の効果】

本発明は、ヒトVEGF受容体Flt-1に特異的に結合するモノクローナル抗体を用いた白血病の診断薬および治療薬を提供する。

【図面の簡単な説明】

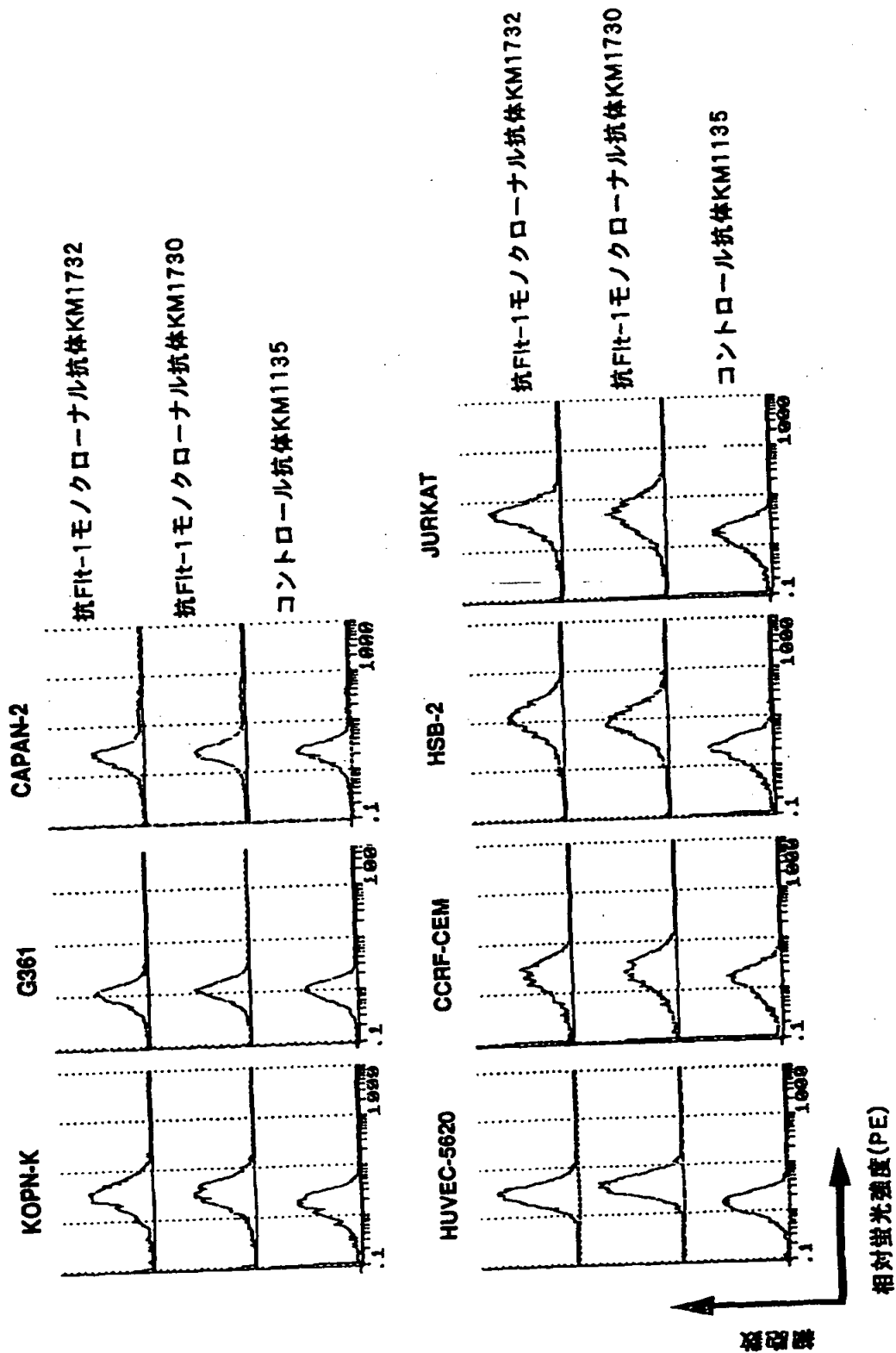
【図1】は抗ヒトVEGF受容体Flt-1モノクローナル抗体KM1730およびKM1732のヒト細胞株KOPN-K、G361、CAPAN-1、HUVEC、HSB-2およびJurkatとの反応性をフローサイトメーターにより解析した結果を示す。

特平 1 1 - 0 5 6 3 7 9

【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 造血系細胞が腫瘍化した疾患である白血病を診断および治療するための有用な方法が求められている。

【解決手段】 本発明は、抗ヒトVEGF受容体Flt-1抗体を有効成分として含有する、白血病の診断薬および治療薬に関する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000001029]

1. 変更年月日	1990年 8月 6日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区大手町1丁目6番1号
氏 名	協和醗酵工業株式会社

明 細 書

白血病の診断薬および治療薬

技術分野

本発明は、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体を用いた白血病の診断方法、ならびに抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体を有効成分とする診断薬および治療薬に関する。

背景技術

血管新生は、脊椎動物の胎生期における循環器系の形成や多くの組織の構築に重要な役割を果たすとともに、成熟個体（雌）においても性周期における黄体形成、子宮内膜の一過性の増殖、胎盤形成などに密接に関与する。さらに、病的状態としては、固形腫瘍の増殖、転移形成、糖尿病性網膜症、慢性関節リュウマチの病態形成、促進に血管新生が深く関与している[J. Biol. Chem., 267, 10931 (1992)]。血管新生を誘導する因子としては、Vascular permeability factor (VPF)/Vascular endothelial growth factor (VEGF)が上記発生段階における血管新生および病的な状態における血管新生において最も重要な因子として知られている[Advances in Cancer Research, 67, 281 (1995)]。

血管新生を伴う疾患の中で、固形腫瘍の増殖、転移形成、糖尿病性網膜症、慢性関節リュウマチの病態形成に VEGF が深く関与していることが報告されている。固形腫瘍については、これまでに腎癌[Cancer Research, 54, 4233 (1994)]、乳癌[Human Pathology, 26, 86 (1995)]、脳腫瘍[J. Clinical Investigation, 91, 153 (1993)]、消化器癌[Cancer Research, 53, 4727 (1993)]、卵巣癌[Cancer Research, 54, 276 (1994)]などの多くのヒト腫瘍組織において VEGF が産生されていることが報告されている。

ヒトの VEGF 受容体としてはこれまでに受容体型チロシンキナーゼファミリーに属する第 1 の受容体である Flt-1(fms-like tyrosine kinase)[Oncogene, 5, 519 (1990); Science, 255, 989 (1992)]および第 2 の受容体である KDR(kinase insert domain-containing receptor) [W092/14748, Priority Feb. 22, 1991; Biochem. Biophys. Res. Comm., 187, 1579 (1992)]の 2 種が報告されている。ヒト型 VEGF 受容体 KDR のマウス型ホモログは Flk-1[Proc. Natl. Acad. Science, USA, 88, 9026 (1991); W094/11499 Priority Nov. 13, 1992; Cell, 72, 835 (1993)]と命名されている。Flt-1 および KDR/Flk-1 の細胞外ドメインは 7 個のイムノグロブリン様ドメインよりなり、細胞内ドメインはチロシンキナーゼドメインを有する分子量 180~200 キロダルトンの膜タンパクよりなる。VEGF は Flt-1 および KDR/Flk-1 にはそれぞれ KD 値が 20 pM および

75 pM で特異的に結合する。Flt-1 および KDR/Flk-1 は血管内皮細胞に特異的に発現していると報告されている[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 7533 (1993); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8915 (1993)]。Flt-1 については、ヒト単球に発現し、細胞の遊走に関与することが報告されている[Blood, 87, 3336 (1996)]。

Flt-1 の様々な疾患における発現については、ヒトグリオブラストーマ組織の腫瘍血管内皮細胞 [Nature, 359, 845(1992)]、ヒト消化器癌組織の腫瘍血管内皮細胞 [Cancer Research, 53, 4727 (1993)] で、正常組織の血管内皮細胞に比べ flt-1 mRNA の発現が上昇していることが報告されている。さらに、慢性関節リュウマチ患者の関節の血管内皮細胞においてもイン・サイチュ・ハイブリダイゼーション (in situ hybridization) により flt-1 mRNA の発現が認められることが報告されている [Journal of Experimental Medicine, 180, 341 (1994)]。これらの結果は、腫瘍血管新生において VEGF-VEGF レセプターFlt-1 系が重要な役割を果たしていることを強く示唆するものである。Flt-1 は VEGF が結合すること、細胞内ドメインが自己リン酸化されることが報告されているが [Science, 255, 989 (1992)]、詳しい機能については不明である。しかし、flt-1 遺伝子を破壊した flt-1 ノックアウトマウスは発生初期の血島形成や、それに続く血管新生において、血管内皮細胞の形態異常により血管構築が異常となり胎生 8.5~9.5 日齢で死亡することから、Flt-1 は血管新生における血管内皮細胞の管腔形成に必須の機能を果たしていると推定されている[Nature, 376, 66 (1995)]。

以上のように、VEGF および VEGF 受容体 Flt-1 は、固形腫瘍の増殖もしくは転移形成に関与することが報告されているが、白血病との関連についてはこれまで報告されていない。

発明の開示

造血系細胞が腫瘍化した疾患である白血病を診断および治療するための有用な方法が求められている。

本発明者らは、VEGF 受容体 Flt-1 に対する抗体が白血病細胞株に高率に反応することを初めて見出し、本発明を完成させた。即ち、本発明は以下の (1) ~ (18) に関する。

- (1) 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体を有効成分として含有する白血病の診断薬。
- (2) 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする上記 (1) 記載の診断薬。
- (3) 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、KM1730、KM1731、KM1732、KM1748 およ

び KM1750 からなる群より選ばれる抗体である上記（１）記載の診断薬。

（４） 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、ヒト化抗体である上記（１）記載の診断薬。

（５） 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体またはジスルフィド安定化抗体からなる群より選ばれる抗体である上記（１）記載の診断薬。

（６） 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に融合させた抗体である上記（１）記載の診断薬。

（７） 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体を有効成分として含有する白血病の治療薬。

（８） 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする上記（７）記載の治療薬。

（９） 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、KM1730、KM1731、KM1732、KM1748 および KM1750 からなる群より選ばれる抗体である上記（７）記載の治療薬。

（１０） 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、ヒト化抗体である上記（７）記載の治療薬。

（１１） 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体およびジスルフィド安定化抗体のいずれかであることを特徴とする上記（７）記載の治療薬。

（１２） 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に融合させた抗体である、上記（７）記載の治療薬。

（１３） 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体を用いる、白血病の診断方法。

（１４） 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする上記（１３）記載の白血病の診断方法。

（１５） 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、KM1730、KM1731、KM1732、KM1748 および KM1750 からなる群より選ばれる抗体である上記（１３）記載の白血病の診断方法。

（１６） 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、ヒト化抗体である上記（１３）記載の白血病の診断方法。

（１７） 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体およびジスルフィド安定化抗体からなる群より選ばれる抗体である上記（１３）記載の白血病の診断方法。

（１８） 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、放射性同位元素、蛋白質または低分

子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に融合させた抗体である、上記（１３）記載の白血病の診断方法。

本発明で使用される抗体は、VEGF 受容体 Flt-1（以下、単に Flt-1 と記す）に結合することができ、かつ白血病の診断あるいは治療効果を有するものであれば、いかなるものでもよい。本発明で使用される抗 Flt-1 抗体は、公知の手段 [アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル、コールド・スプリングハーバー・ラボラトリー (Antibodies-A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)、以下、アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアルと記す] を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。

本発明で使用される抗 Flt-1 抗体として、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体のいずれも用いることができるが、哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。

哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマにより産生される抗体、抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した形質転換体により生産される遺伝子組換え抗体およびヒト抗体をあげることができる。

本発明で使用されるモノクローナル抗体は、以下に述べる製造法によって確立したものが好適なものとしてあげられる。

すなわち、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 タンパク質を抗原として調製し、該抗原を免疫した動物より抗原特異性をもつ形質細胞を誘導し、さらに、それと骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマを培養するか、あるいは該ハイブリドーマ細胞を動物に投与して該動物を腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより取得された、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体をあげることができる。

本発明で使用される遺伝子組換え抗体としては、上記本発明のモノクローナル抗体を遺伝子組換え技術を用いて改変したものであげられるが、具体的にはヒト化抗体、抗体断片などをあげることができる。該抗体において、抗原性が低く、血中半減期の延長されたものは、治療薬として好ましい。

本発明で使用されるヒト化抗体は、ヒト型キメラ抗体およびヒト型 CDR (Complementary Determining Region; 相補性決定領域 以下、CDR と記す) 移植抗体を包含する。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体可変領域重鎖（以下、VH と称す）および可変領域軽鎖（以下、VL と称す）とヒト抗体の定常領域重鎖（以下、CH と称す）およびヒト抗体の定常領域軽鎖（以下、CL と称す）とからなる抗体を意味する。

本発明で使用されるヒト型キメラ抗体は、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に結合するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VH および VL をコードする cDNA を取得し、ヒト抗体 CH およびヒト抗体 CL をコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ製造することができる。

ヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト抗体の VH および VL の CDR をヒト以外の動物の抗体の CDR 配列でそれぞれ置換した抗体を意味する。

本発明で使用されるヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に結合する、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR 配列で任意のヒト抗体の VH および VL の CDR 配列をそれぞれ置換した V 領域をコードする cDNA を構築し、ヒト抗体の CH およびヒト抗体の CL をコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入し、発現させることにより製造することができる。

本発明で使用されるヒト型キメラ抗体およびヒト型 CDR 移植抗体のヒト抗体部分はいずれのイムノグロブリン(Ig)クラスに属するものでもよいが IgG 型のものが好適であり、IgG 型に属する IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 等のイムノグロブリンの C 領域のいずれも用いることができる。

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体を意味するが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体等も含まれる。

ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、EB ウイルス等を感染させ不死化、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養でき、培養物中より該抗体を精製することができる。

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒト B 細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することにより Fab、一本鎖抗体等の抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的手法により、2 本の完全な H 鎖および 2 本の完全な L 鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込まれた動物を意味する。具体的には、マウス ES 細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該 ES 細胞を他のマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニック動物を作製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法は、通常のヒト以外の哺乳動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを得、培養することで培養物中にヒト抗体を産生蓄積させることができる。

本発明で使用する抗体断片は、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に対して結合性を示す抗体断片である Fab (Fragment of antigen binding の略)、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体(single chain Fv; 以下、scFv と称す) およびジスルフィド安定化抗体(disulfide stabilized Fv; 以下、dsFv と称す)を包含する。

Fab は、IgG のヒンジ領域で 2 本の H 鎖を架橋している 2 つのジスルフィド結合の上部のペプチド部分を酵素パパイニンで分解して得られた、H 鎖の N 末端側約半分と L 鎖全体で構成された、分子量約 5 万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

本発明で使用する Fab は、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体をパパイニン処理して得ることができる。または、該抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体の Fab 断片をコードする DNA を動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、Fab を製造することができる。

Fab' は、上記 F(ab')₂ のヒンジ間のジスルフィド結合を切断した分子量約 5 万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

本発明で使用する Fab' は、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体の Fab' 断片をコードする DNA を動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、Fab' を製造することができる。

F(ab')₂ は、IgG のヒンジ領域の 2 個のジスルフィド結合の下部を酵素トリプシンで分解して得られた、2 つの Fab 領域がヒンジ部分で結合して構成された、分子量約 10 万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

本発明で使用する F(ab')₂ は、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体をトリプシン処理して得ることができる。または、該抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体の F(ab')₂ 断片をコードする DNA を動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、F(ab')₂ を製造することができる。

一本鎖抗体 (scFv) は、一本の VH と一本の VL とを適当なペプチドリinker (以下、P と称す) を用いて連結した、VH-P-VL ないしは VL-P-VH ポリペプチドである。本発明で使用する scFv に含まれる VH および VL は、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体あるいはヒト型 CDR 移植抗体のいずれをも用いることができる。

本発明で使用する一本鎖抗体は、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に結合する抗体を生産するハイブリドーマより VH および VL をコードする cDNA を取得し、一本鎖抗体発現ベクターを構築し、大腸菌、酵母、動物細胞あるいは昆虫細胞へ導入することにより発現させ製造することができる。

ジスルフィド安定化抗体 (dsFv) は、VH および VL 中のそれぞれ 1 アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドをジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基は Reiter らにより示された方法 [Protein Engineering, 7, 697 (1994)] に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明で使用するジスルフィド安定化抗体に含まれる VH あるいは VL はマウス型抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体あるいはヒト型 CDR 移植抗体のいずれをも用いることができる。

本発明で使用するジスルフィド安定化抗体は、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に反応する抗体を生産するハイブリドーマより VH および VL をコードする cDNA を取得し、適当な発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを大腸菌、酵母、動物細胞あるいは昆虫細胞へ導入し発現させることにより製造することができる。

融合抗体は、上述の抗体に放射性同位元素、蛋白質、低分子の薬剤などを化学的あるいは遺伝子工学的に融合させたものをいう。

本発明で使用する融合抗体は、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に結合する抗体に放射性同位元素、蛋白質あるいは低分子の薬剤などを化学的に融合させることにより製造することができる。また、蛋白質との融合抗体については、抗体をコードする cDNA に蛋白質をコードする cDNA を連結させ、適当な発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを大腸菌、酵母、動物細胞あるいは昆虫細胞に発現させることにより製造することができる。

1. 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体の作製方法

(1) 抗原の調製

抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体を作製するために必要な抗原としては、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を細胞表面に発現した細胞あるいはその細胞膜画分、または、アミノ酸の長さの異なる細胞外領域を有する可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 蛋

白質あるいは該蛋白質と抗体の Fc 部分との融合蛋白質などがあげられる。

ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を細胞表面に発現する細胞としては、NIH3T3-Flt-1 細胞 [Cell Growth & Differentiation, 7, 213 (1996)] があげられる。ヒト VEGF 受容体 Flt-1 をコードする全長あるいはその部分断片 cDNA [Cell Growth & Differentiation, 7, 213 (1996)] を適当なベクターのプロモーター下流に挿入した組み換え体ベクターを造成し、それを宿主細胞に導入することにより得られたヒト VEGF 受容体 Flt-1 発現細胞を、適当な培地中で培養することにより細胞内あるいは培養上清中にヒト VEGF 受容体 Flt-1 の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として生産することができる。また、上述の蛋白質の部分配列を有するポリペプチドをアミノ酸合成機を用いて合成することによっても調製することができる。

宿主としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞など、目的とする遺伝子を発現できるものであれば、いずれでもよい。細菌としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*)、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 等のエシェリヒア属、バチルス属等の細菌が例示される。酵母としては、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ボンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) 等が例示される。動物細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ細胞、サルの細胞である COS 細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である CHO 細胞等が例示される。昆虫細胞としては、Sf9、Sf21 (ファーミンジェン社製)、High Five (インビトロジェン社製) 等が例示される。

Flt-1 をコードする DNA を導入するベクターとしては、該 DNA を組み込むことができ、宿主細胞で発現できるものであればいかなるベクターでも用いることができる。

細菌、例えばエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) を宿主として用いる場合の発現ベクターとしては、プロモーター、リボゾーム結合配列、本発明の DNA、転写終結配列、場合によってはプロモーターの制御配列より構成されているのが好ましいが、例えば、市販の pGEX (ファルマシア社製)、pET システム (ノバジェン社製) などが例示される。

細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌に DNA を導入する方法であれば、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭 63-248394) 等、いずれの方法も用いられる。

酵母を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEpl3(ATCC37115)、YEpl24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419) 等が用いられる。

酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母に DNA を導入する方法であれば、

例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzymol., 194, 182-187 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)] 等、いずれの方法も用いられる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pAGE107 [特開平 3-22979 ; Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)] 等が用いられる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいかなるものを用いてもよいが、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) の IE(immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40 あるいはメタロチオネインのプロモーター等があげられる。また、ヒト CMV の IE 遺伝子のエンハンサーをプロモーターとともに用いてもよい。

動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞に DNA を導入する方法であれば、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法(特開平 2-227075)、リポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等、いずれの方法も用いられる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、サブルメント 1 ~ 3 4 (Current Protocols in Molecular Biology Supplement 1-34)、バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル (Baculovirus Expression Vectors A Laboratory Manual) 等に記載された方法によって、タンパク質を発現することができる。すなわち、以下に述べる組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得たのち、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質発現昆虫細胞を取得する。

遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにインビトロジェン社製) 等が用いられる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) などが用いられる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等が用いられる。

また、ファーミンジェン社製バキュロゴールドスターターキットなどを用いて組み

換えバキュロウィルスを作製したのち、前述した Sf9、Sf21 あるいは High Five 等の昆虫細胞に該組み換えウィルスを感染させることにより蛋白質を生産させることもできる [Bio/Technology, 6, 47 (1988)]。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、分泌生産、融合蛋白質発現等が開発されており、いずれの方法も用いることができる。例えば、モレキュラー・クローニング 第2版、コールドスプリングハーバーラボラトリー・プレス [Molecular Cloning 2nd edition, Cold Spring Harbor Lab. Press New York (1989)]；以下、「モレキュラー・クローニング 第2版」と記す]に記載されている方法に準じて行うことができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中にヒト VEGF 受容体 Flt-1 の全長あるいは部分断片を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として製造することができる。

上記の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

大腸菌あるいは酵母等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい (モレキュラー・クローニング 第2版)。培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下、15~40℃で 16~96 時間行う。培養期間中、pH は 3.0~9.0 に保持する。pH の調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。培養中は必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている RPMI1640 培地、Eagle の MEM 培地またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、通常 5%CO₂ 存在下、35~37℃で 3~7 日間行い、培養中は必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている TNM-FH 培地 [ファーミンジェン (Pharmlngen) 社製]、Sf900IISFM [ライフテクノロジー (Life Technologies) 社製]、ExCell400、ExCell405 [いずれも JRH バイオサイエンス (JRH Biosciences) 社製] 等が用いられる。培養は、25~30℃で 1~4 日間行い、培養中は必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を

培地に添加してもよい。

上記において、動物細胞および昆虫細胞の培養において可能であれば、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として精製することを容易にするため、血清無添加の培地を用いることが好ましい。

ヒト VEGF 受容体 Flt-1 の全長あるいは部分断片がそのままあるいは融合蛋白質として宿主細胞内に蓄積された場合には、培養終了後、細胞を遠心分離し、水系緩衝液にけん濁後、超音波法、フレンチプレス法などにより細胞を破碎し、その遠心分離上清に該蛋白質を回収する。

さらに、細胞内に不溶体を形成した場合には、不溶体をタンパク質変性剤で可溶化後、タンパク質変性剤を含まないあるいはタンパク質変性剤の濃度がタンパク質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、タンパク質の立体構造を形成させることができる。

ヒト VEGF 受容体 Flt-1 の全長あるいは部分断片がそのままあるいは融合蛋白質として細胞外に分泌された場合には、培養上清中に発現蛋白質を回収することができる。

単離精製については、溶媒抽出、有機溶媒による分別沈殿、塩析、透析、遠心分離、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、結晶化、電気泳動などの分離操作を単独あるいは組み合わせて行うことができる。

部分配列を有するポリペプチドは、Fmoc 法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc 法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、桑和貿易（米国 Advanced chemTech 社製）、パーキンエルマージャパン（米国 Perkin-Elmer 社製）、アロカ（米国 Protein Technology Instrument 社製）、クラボウ（米国 Synthecell-Vega 社製）、日本パーセプティブ・リミテッド（米国 PerSeptive 社製）、島津製作所等のペプチド合成機を用いても製造することができる。

（２）動物の免疫と抗体産生細胞の調製

上記で得られた該蛋白質を抗原として動物を免疫する。免疫する方法としては、動物の皮下、静脈内または腹腔内に抗原をそのまま投与してもよいが、抗原性の高いキャリアタンパク質を抗原に結合させて投与する、あるいは適当なアジュバントとともに抗原を投与することが好ましい。

キャリアタンパク質としては、スカシガイヘモシアニン、キーホールリンベットヘモシアニン、牛血清アルブミン、牛チログロブリン等があげられ、アジュバンドとし

ては、フロインドの完全アジュバント(Complete Freund's Adjuvant)、水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチン等があげられる。

免疫動物としては、ウサギ、ヤギ、マウス、ラット、ハムスターなどの非ヒト哺乳動物があげられる。

抗原の投与は、1回目の投与の後、1～2週間毎に3～10回行う。抗原の投与量は動物1匹当たり50～100 μ gが好ましい。各投与後、3～7日目に免疫動物の眼底静脈叢あるいは尾静脈より採血し、該血清の抗原との反応性について、酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法(ELISA法)：医学書院刊(1976年)〕などで確認する。

そして、該血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物を、抗体産生細胞の供給源とする。

抗原の最終投与後3～7日目に、免疫動物より公知の方法(アンチボディース・ア・ラボラトリー・マニュアル)に準じてリンパ球を摘出し、リンパ球と骨髓腫細胞とを融合させる。

ポリクローナル抗体は、該血清を分離、精製することにより調製することができる。

モノクローナル抗体は、該抗体産生細胞と非ヒト哺乳動物由来の骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマを培養するか、動物に投与して該細胞を腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより調製することができる。

抗体産生細胞は、抗原投与された非ヒト哺乳動物脾細胞、リンパ節、末梢血などから採取する。

(3) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞である、8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c由来)骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1(P3-U1) [Eur. J. Immunol., 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14(SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653) [J. Immunol., 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495 (1975)] など、イン・ビトロ(in vitro)で増殖可能な骨髓腫細胞であればいかなるものでもよい。これらの細胞株の培養および継代については公知の方法(アンチボディース・ア・ラボラトリー・マニュアル)に従い、細胞融合時までに 2×10^7 個以上の細胞数を確保する。

(4) 細胞融合とモノクローナル抗体の選択

上記で得られた抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを洗浄したのち、ポリエチレングライコール-1000(PEG-1000)などの細胞凝集性媒体を加え、細胞を融合させ、培地中に懸

濁させる。細胞の洗浄には MEM 培地または PBS (リン酸二ナトリウム 1.83g、リン酸一カリウム 0.21g、食塩 7.65g、蒸留水 1 リットル、pH7.2) などを用いる。また、融合細胞を懸濁させる培地としては、目的の融合細胞のみを選択的に得られるように、HAT 培地 {正常培地 [RPMI-1640 培地にグルタミン(1.5mM)、2-メルカプトエタノール ($5 \times 10^{-5}M$)、ジェンタマイシン($10 \mu g/ml$) および牛胎児血清(FCS) (CSL 社製、10%) を加えた培地] にヒポキサンチン ($10^{-4}M$)、チミジン ($1.5 \times 10^{-5}M$) およびアミノプテリン ($4 \times 10^{-7}M$) を加えた培地} を用いる。

培養後、培養上清の一部をとり、酵素免疫測定法により、抗原蛋白質に反応し、非抗原蛋白質に反応しないサンプルを選択する。ついで、限界希釈法によりクローニングを行い、下記の酵素免疫測定法により安定して高い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株を選択する。

酵素免疫測定法

抗原蛋白質あるいは抗原蛋白質を発現した細胞などをプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは上述の方法で得られる精製抗体を第一抗体として反応させる。

第一抗体反応後、プレートを洗浄して第二抗体を添加する。

第二抗体とは、第一抗体を認識できる抗体に、ビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識したものである。具体的には、ハイブリドーマ作製の際にマウスを用いたのであれば、第二抗体としては、マウスイムノグロブリンを認識できる抗体を用いる。

反応後、第二抗体を標識した物質に応じた反応を行い、抗原に特異的に反応するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

抗 Flt-1 モノクローナル抗体の具体例としては、W098/22616 に記載されているハイブリドーマ KM1732(FERM BP-5698)が生産するマウス IgG1 サブクラスに属するモノクローナル抗体 KM1732、ハイブリドーマ KM1730(FERM BP-5697)が生産するマウス IgG2b サブクラスに属するモノクローナル抗体 KM1730、ハイブリドーマ KM1731(FERM BP-5718)が生産するマウス IgG2a サブクラスに属するモノクローナル抗体 KM1731、ハイブリドーマ KM1748(FERM BP-5699)が生産するマウス IgG2b サブクラスに属するモノクローナル抗体 KM1748、および、ハイブリドーマ KM1750(FERM BP-5700)が生産するマウス IgG2b サブクラスに属するモノクローナル抗体 KM1750 などがあげられる。

(5) モノクローナル抗体の調製

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞を培養して得られる培養液、またはブ

リスタン処理〔2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン(Pristane)0.5ml を腹腔内投与し、2 週間飼育する〕した 8 ～10 週令のマウスまたはヌードマウスに、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を腹腔内投与して腹水癌化させた腹水から、分離、精製することにより調製できる。

モノクローナル抗体を分離、精製する方法としては、遠心分離、40～50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿法、DEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテイン A-または G-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて行う方法があげられる。この方法により、IgG あるいは IgM 画分を回収し、精製モノクローナル抗体を取得することができる。

精製モノクローナル抗体のサブクラスの決定は、モノクローナル抗体タイピングキットなどを用いて行うことができる。蛋白質量は、ローリー法あるいは 280nm での吸光度より算出することができる。

抗体のサブクラスとは、クラス内のアイソタイプのことで、マウスでは、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、ヒトでは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 があげられるが、特にマウス IgG1、IgG2a、ヒト IgG1 タイプは、補体依存性細胞傷害活性（以下、CDC 活性）および抗体依存性細胞傷害活性（以下、ADCC 活性）を有し、治療への応用上、有用である。

2. 組換え抗体の作製方法（1）－抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ヒト化抗体の作製方法

（1）ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト以外の動物の抗体からヒト化抗体を作製するために必要なヒト化抗体発現用ベクターを構築する。ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体の C 領域である CH および CL をコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子をそれぞれ挿入することにより構築されたものである。

ヒト抗体の C 領域としては、例えば、ヒト抗体 H 鎖では C γ 1 や C γ 4、ヒト抗体 L 鎖では C κ 等の任意のヒト抗体の C 領域を用いることができる。ヒト抗体の C 領域をコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンより成る染色体 DNA を用いることができ、また、cDNA を用いることもできる。動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体 C 領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。

例えば、pAGE107 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [Gene, 27, 223 (1984)]、pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527 (1981)]、pSG1 β d2-4 [Cytotechnology, 4, 173 (1990)] 等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40 の初期プロモーターとエンハンサー [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスのLTR プロモーターとエンハンサー [Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1987)]、および免疫グロブリン H 鎖のプロモーター [Cell, 41, 479 (1985)] とエンハンサー [Cell, 33, 717 (1983)] 等があげられる。

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体 H 鎖、L 鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ (タンデム型) のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築のしやすさ、動物細胞への導入のし易さ、動物細胞内での抗体 H 鎖および L 鎖の発現量のバランスがとれる等の点でタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい [J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)]。

(2) ヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA の取得

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体の VH および VL をコードする cDNA は以下のようにして取得する。

抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体を産生する細胞、例えば、マウスヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体産生ハイブリドーマ等より mRNA を抽出し、cDNA を合成する。合成した cDNA を、ファージあるいはプラスミドなどのベクターに挿入し、cDNA ライブラリーを作製する。該ライブラリーより、ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体の C 領域部分あるいは V 領域部分をプローブとして用い、VH をコードする cDNA を有する組換えファージあるいは組換えプラスミド、および VL をコードする cDNA を有する組換えファージあるいは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージあるいは組換えプラスミド上の目的とする抗体の VH および VL の全塩基配列を決定し、塩基配列より VH および VL の全アミノ酸配列を推定する。

(3) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

前記 2 (1) で構築したヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流に、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA を挿入し、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、キメラ抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流にあらかじめヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA をクローニングするため

の制限酵素の認識配列を設けておき、このクローニングサイトにヒト以外の動物の抗体のV領域をコードするcDNAを下記に述べる合成DNAを介して挿入することにより、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを製造することができる。合成DNAは、ヒト以外の動物の抗体のV領域の3'末端側の塩基配列とヒト抗体のC領域の5'末端側の塩基配列とからなるものであり、両端に適当な制限酵素部位を有するようにDNA合成機を用いて製造する。

(4) ヒト以外の動物の抗体のCDR配列の同定

抗体の抗原結合部位を形成するVH及びVLは、配列の比較的保存された4個のフレームワーク領域(以下、FR領域と称す)とそれらを連結する配列の変化に富んだ3個の相補性決定領域(CDR)から成っている[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991: 以下、「シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト」と略記する]。そして各CDRアミノ酸配列(CDR配列)は、既知の抗体のV領域のアミノ酸配列[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト]と比較することにより同定することができる。

(5) ヒト型CDR移植抗体のV領域をコードするcDNAの構築

ヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAは以下のようにして取得することができる。

まず、目的のヒト以外の動物の抗体のV領域のCDRを移植するためのヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列をVH、VLそれぞれについて選択する。ヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のV領域のFRのアミノ酸配列であればいかなるものでも用いることができる。

例えば、Protein Data Bankに登録されているヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列、ヒト抗体のV領域のFRの各サブグループの共通アミノ酸配列[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト]があげられるが、十分な活性を有するヒト型CDR移植抗体を創製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体のV領域のアミノ酸配列と高い相同性、好ましくは65%以上の相同性を有することが望ましい。次に、選択したヒト抗体のV領域のFRのアミノ酸配列をコードするDNA配列と目的のヒト以外の動物の抗体のV領域のCDRのアミノ酸配列をコードするDNA配列を連結させて、VH、VLそれぞれのアミノ酸配列をコードするDNA配列を設計する。CDR移植抗体可変領域遺伝子を構築するために設計したDNA配列を得るためには、

全 DNA 配列をカバーするように各鎖について数本の合成 DNA を設計し、それらを用いてポリメラーゼ・チェーン・リアクション (Polymerase Chain Reaction ; 以下、PCR と記す) を行う。PCR での反応効率および合成可能な DNA の長さから各鎖について、好ましくは、6 本の合成 DNA を設計する。反応後、増幅断片を適当なベクターにサブクローニングし、その塩基配列を決定し、目的のヒト型 CDR 移植抗体の各鎖の V 領域のアミノ酸配列をコードする cDNA を含むプラスミドを取得する。また、約 100 塩基よりなる合成 DNA を用いてセンス、アンチセンスともに全配列を合成し、それらをアニーリング、連結することで、目的のヒト型 CDR 移植抗体の各鎖の V 領域のアミノ酸配列をコードする cDNA を構築することもできる。

(6) ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型 CDR 移植抗体は目的のヒト以外の動物の抗体の V 領域の CDR のみをヒト抗体の V 領域の FR 間に、単純に移植しただけでは、その活性はもとのヒト以外の動物の抗体の活性に比べて低下してしまうことが知られている [BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991)]。そこでヒト抗体の V 領域の FR のアミノ酸配列のうち、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基、CDR のアミノ酸残基と相互作用をしているアミノ酸残基、あるいは抗体の立体構造の維持に関与している等の可能性を有するアミノ酸残基をもとのヒト以外の動物の抗体に見出されるアミノ酸残基に改変し、活性を上昇させることが行われている。そして、それらのアミノ酸残基を効率よく同定するため、X 線結晶解析あるいはコンピューターモデリング等を用いた抗体の立体構造の構築および解析を行っている。しかし、いかなる抗体にも適応可能なヒト型 CDR 移植抗体の製造法は未だ確立されておらず、現状では個々の抗体によって種々の試行錯誤が必要である。

選択したヒト抗体の V 領域の FR のアミノ酸配列の改変は各種の変異導入プライマーを用いて前記 2 (5) に記載の PCR を行うことにより達成できる。PCR 後の増幅断片を適当なベクターにサブクローニング後、その塩基配列を決定し、目的の変異が導入された cDNA を含むベクター (以下、アミノ酸配列改変ベクターと称す) を取得する。

また、狭い領域のアミノ酸配列の改変であれば、20~35 塩基からなる変異導入プライマーを用いた PCR 変異導入法により行うことができる。具体的には、改変後のアミノ酸残基をコードする DNA 配列を含む 20~35 塩基からなるセンス変異プライマー及びアンチセンス変異プライマーを合成し、改変すべき V 領域のアミノ酸配列をコードする cDNA を含むプラスミドを鋳型として 2 段階の PCR を行う。最終増幅断片を適当

なベクターにサブクローニング後、その塩基配列を決定し、目的の変異が導入された cDNA を含むアミノ酸配列改変ベクターを取得する。

(7) ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターの構築

前記 2 (1) のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH 及び CL をコードする遺伝子上流に、前記 2 (5) および 2 (6) で取得したヒト型 CDR 移植抗体の VH 及び VL をコードする cDNA を挿入し、ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト型 CDR 移植抗体の VH 及び VL のアミノ酸配列をコードする cDNA を構築するための PCR の際に 5' 末端および 3' 末端の合成 DNA の末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、所望のヒト抗体の C 領域をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するように挿入することができる。

(8) ヒト化抗体の一過性 (トランジェント) 発現および活性評価

多種類のヒト化抗体の活性を効率的に評価するために、前記 2 (3) のヒト型キメラ抗体発現ベクター、および前記 2 (7) のヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターあるいはそれらの改変ベクターを COS-7 細胞 (ATCC CRL1651) に導入してヒト化抗体の一過性発現 [メソッズ・イン・ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Methods in Nucleic Acids Res.), CRC Press, p.283, 1991] を行い、その活性を測定することができる。

COS-7 細胞への発現ベクターの導入法としては、DEAE- デキストラン法 [メソッズ・イン・ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Methods in Nucleic Acids Res.), CRC Press, p.283, 1991]、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci., 84, 7413 (1987)] 等があげられる。

ベクターの導入後、培養上清中のヒト化抗体の活性は前記 1 (4) に記載の酵素免疫測定法 (ELISA 法) 等により測定することができる。

(9) ヒト化抗体の安定 (ステーブル) 発現および活性評価

前記 2 (3) のヒト型キメラ抗体発現ベクターおよび前記 2 (7) のヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することによりヒト化抗体を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

宿主細胞への発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法 [特開平 2-257891、Cytotechnology, 3, 133 (1990)] 等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、マウス SP2/0-Ag14 細胞 (ATCC CRL1581)、マウス P3X63-Ag8.653 細胞 (ATCC CRL1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (以下、DHFR 遺伝子と称す) が欠損した CHO 細胞 [Proc.

Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980)]、ラット YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞 (ATCC CRL1662、以下、YB2/0 細胞と称す) 等があげられる。

ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、G418 および FCS を含む RPMI1640 培地により選択する。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養液中にヒト化抗体を生産蓄積させることができる。培養液中のヒト化抗体の活性は前記 1 (4) に記載の方法などにより測定する。また、形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、DHFR 遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる。

ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテイン A カラムを用いて精製することができる [アンチボディズ (Antibodies), A Laboratory Manual, ColdSpring Harbor Laboratory, Chapter 8, 1988 ; 以下、「アンチボディズ」と記す]。また、その他に、通常の蛋白質で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過等を組合せて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体の H 鎖、L 鎖あるいは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) [Nature, 227, 680 (1970)] やウエスタンブロットティング法 (アンチボディズ, Chapter 12, 1988) 等で測定する。

精製したヒト化抗体の反応性、また、ヒト化抗体の VEGF に対する阻害活性の測定は前記 1 (4) に記載の方法などにより測定することができる。

3. 組換え抗体の作製方法 (2)

(1) 抗体断片 Fab、Fab'、F(ab')₂ の作製方法

上述した抗体を酵素で処理することにより、抗体断片を生成させる。酵素としては、パパイン、トリプシンなどをあげることができる。

または、該抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体の Fab、Fab' あるいは F(ab')₂ 断片をコードする DNA を動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、Fab、Fab' あるいは F(ab')₂ を製造することができる。

生成される抗体断片は、ゲル濾過、イオン交換、アフィニティークロマトグラフィーおよび限外濾過等を組み合わせて行い、生成することができる。精製した Fab、Fab'、F(ab')₂ 分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) [Nature, 227, 680 (1970)] やウエスタンブロットティング法 (アンチボディズ, Chapter 12, 1988) 等で測定する。

精製した Fab、Fab'、F(ab')₂ の反応性、また、Fab、Fab'、F(ab')₂ の VEGF に対する阻害活性の測定は前記 1 (4) に記載の方法などにより測定することができる。

(2) 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 一本鎖抗体の作製方法

前記2(2)、2(5)および2(6)に記載のヒト以外の動物の抗体あるいはヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA を一本鎖抗体発現用ベクターに挿入することによりヒト以外の動物の抗体の一本鎖抗体あるいはヒト型 CDR 移植抗体の一本鎖抗体の発現ベクターを構築することができる。ここで用いる一本鎖抗体発現用ベクターとしてはヒト以外の動物の抗体あるいはヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA を組み込み発現できるものであれば、いかなるものでも用いることができる。

例えば、pAGE107[Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAGE103[J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [Gene, 27, 223(1984)]、pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 78, 1527 (1981)]、pSG1 β d2-4 [Cytotechnology, 4, 173 (1990)] 等があげられる。一本鎖抗体を発現させるための宿主としては、大腸菌、酵母、動物細胞等の中から適切なものを選択することができるが、その場合の発現用ベクターとしては、それぞれの宿主に適切なものを選択する必要がある。また、適切なシグナルペプチドをコードする cDNA を発現用ベクターに挿入することで一本鎖抗体を細胞外に分泌させ、ペリプラズマ領域に輸送させ、あるいは細胞内に留まらせることができる。

選択された発現用ベクターに、VH-P-VL あるいは VL-P-VH (P はペプチドリinker) からなる一本鎖抗体をコードする cDNA を適切なプロモーター、シグナルペプチドの下流に挿入することにより、目的の一本鎖抗体をコードする cDNA が挿入された一本鎖抗体発現ベクターを構築することができる。

一本鎖抗体をコードする cDNA は、VH をコードする cDNA と VL をコードする cDNA とを、両端に適当な制限酵素の認識配列を有するペプチドリinkerをコードする合成 DNA を用いて連結することにより得ることができる。リンカーペプチドは、その付加が VH、VL の抗原への結合に対して妨害しないように最適化することが重要で、例えば Pantoliano らにより示されたもの [Biochemistry, 30, 10117 (1991)] あるいはそれを改変したものを用いることができる。

(3) 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 ジスルフィド安定化抗体の作製方法

ジスルフィド安定化抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA あるいはヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA のそれぞれの適切な位置の 1 アミノ酸残基に相当する DNA 配列をシステイン残基に相当する DNA 配

列に改変し、発現および精製したのち、ジスルフィド結合を形成させることで作製することができる。アミノ酸残基のシステイン残基への改変は前記 2 (5) に記載の PCR を用いた変異導入法により行うことができる。

得られた改変 VH および改変 VL をコードする cDNA を適切な発現用ベクターに挿入することによりジスルフィド安定化抗体 H 鎖発現ベクターおよびジスルフィド安定化抗体 L 鎖発現ベクターを構築することができる。ここで用いるジスルフィド安定化抗体発現用ベクターとしては改変 VH および改変 VL をコードする cDNA を組み込み発現できるものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [Gene, 27, 223 (1984)]、pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527 (1981)]、pSG1 β d2-4 [Cytotechnology, 4, 173 (1990)] 等があげられる。ジスルフィド安定化抗体を形成させるために用いるジスルフィド安定化抗体 L 鎖発現ベクターおよびジスルフィド安定化抗体 H 鎖発現ベクターを発現させるための宿主としては、大腸菌、酵母、動物細胞等の中から適切なものを選択することができるが、その場合の発現用ベクターとしては、それぞれの宿主に適切なものを選択する必要がある。また、適切なシグナルペプチドをコードする cDNA を発現用ベクターに挿入することでジスルフィド安定化抗体を細胞外に分泌させ、ペリプラズマ領域に輸送させ、あるいは細胞内に留まらせることができる。

(4) 各種抗体の発現および活性評価

前記 (1) ~ (3) で構築された抗体断片発現ベクター、一本鎖抗体発現ベクター、ジスルフィド安定化抗体 H 鎖発現ベクターあるいはジスルフィド安定化抗体 L 鎖発現ベクターをエレクトロポレーション法 [特開平 2-257891、サイトテクノロジー Cytotechnology, 3, 133 (1990)] 等の方法により宿主細胞へ導入することにより、目的の抗体断片、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体 H 鎖あるいはジスルフィド安定化抗体 L 鎖を生産する形質転換株を取得することができる。発現ベクターの導入後、培養上清等に含まれる抗体断片、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体 H 鎖あるいはジスルフィド安定化抗体 L 鎖の発現は前記 1 (4) に記載の方法等により確認することができる。

抗体断片、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖の回収および精製は公知の技術を組み合わせることにより達成することができる。例えば、抗体断片、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖が培地中に分泌されるならば、限外濾過により濃縮することができ、次いで各種クロマトグラフィーあるいはゲル濾過を実行することにより達成することができる。また、宿主細胞のペリプラズマ領域へと輸送されるならば、その細胞に浸透圧ショックを与え、限外濾過により濃縮することができ、次いで各種クロマトグラフィーあるいはゲル濾過を実行することにより達成することができる。不溶性であり、かつ顆粒（インクルージョン・ボディー）として存在している抗体断片、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化抗体H鎖あるいはジスルフィド安定化抗体L鎖は、細胞の溶解、顆粒を単離するための遠心分離と洗浄の繰り返し、例えばグアニジン-塩酸による可溶化後、各種クロマトグラフィーあるいはゲル濾過を実行することにより達成することができる。

精製された抗体断片および一本鎖抗体の活性は、前記1（4）に記載の方法等により測定することができる。

精製されたジスルフィド安定化抗体H鎖とジスルフィド安定化抗体L鎖は、各々を混合したのち、活性を有する構造へと導く操作 [refolding 操作, Molecular Immunology, 32, 249 (1995)] によりジスルフィド結合を形成させた後、抗原アフィニティークロマトグラフィーもしくはイオン交換クロマトグラフィーまたはゲルろ過により活性を有するジスルフィド安定化抗体を精製することができる。ジスルフィド安定化抗体の活性は前記1（4）に記載の方法等により測定することができる。

4. 融合抗体の作製方法

本発明で使用される抗体あるいは該抗体断片に、放射性同位元素、蛋白質、低分子の薬剤などを、化学的あるいは遺伝子工学的に融合させた融合抗体も抗体の誘導体として使用することができる。抗体と毒素蛋白とを化学的に融合させた融合抗体は例えば Anticancer Research, 11, 2003 (1991); Nature Medicine, 3, 350 (1996) に従って作製することができる。抗体と毒素、サイトカイン等の蛋白質とを遺伝子工学的に融合させた融合抗体は例えば Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 974 (1996), Proc. Natl.

Acad. Sci. USA, 93, 7826 (1996)に従って作製することができる。抗体と低分子抗癌剤を化学的に融合させた融合抗体は例えば Science, 261, 212 (1993)に従って作製することができる。抗体と放射性同位元素を化学的に融合させた融合抗体は例えば Antibody Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals, 3, 60 (1990); Anticancer Research, 11, 2003 (1991)に従って作製することができる。

これらの誘導体は、抗体分子の特異性に従って放射性同位元素、蛋白質（サイトカイン、トキシン、酵素など）、低分子の薬剤などを標的組織周辺に集積させることで、より効果的で副作用の少ない診断あるいは治療を可能にすることが期待されている。

5. 抗体の使用方法

上述した抗 Flt-1 抗体、該抗体断片あるいはそれらと他分子との融合抗体は、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 と結合し、ADCC、CDC 等の抗体のエフェクター活性を介して Flt-1 発現細胞を破壊するため、白血病の治療等に有用であると考えられる。

本発明の抗体を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができる、抗体製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該化合物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製する。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人 1 日当たり $10 \mu\text{g/kg} \sim 8\text{mg/kg}$ である。

本発明で示した VEGF 受容体 Flt-1 に対するモノクローナル抗体は、白血病細胞に高率に反応することから、白血病の診断薬あるいは治療薬に用いることができる。

また、本発明で使用される抗体の白血病細胞に対する抗腫瘍効果を検討する方法は、インビトロ実験としては、補体依存性細胞障害活性 (CDC 活性) 測定法、抗体依存性細胞障害活性 (ADCC 活性) 測定法等があげられ、インビボ実験としては、マウス等の実験動物での腫瘍系を用いた抗腫瘍実験等があげられる。

CDC 活性および ADCC 活性などの抗腫瘍実験は、Cancer Immunology Immunotherapy, 36, 373 (1993), Cancer Research, 54, 1511 (1994) 等記載の方法に従い行うことができる。

6. 白血病の診断方法

白血病の診断方法として、被験者の細胞あるいは組織に存在するヒト VEGF 受容体

Flt-1 を下記の述べる免疫学的に検出または定量する方法があげられる。

VEGF 受容体 Flt-1 に対する抗体を用いて白血病細胞を免疫学的に検出する方法としては、蛍光抗体法、免疫酵素抗体法 (ELISA)、放射性物質標識免疫抗体法 (RIA)、免疫組織染色法、免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法 (ABC 法、CSA 法等)、ウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、上記に記した酵素免疫測定法、サンドイッチ ELISA 法 [単クローン抗体実験マニュアル (講談社サイエンティフィック、1987 年)、続生化学実験講座 5 免疫生化学研究法 (東京化学同人、1986 年)] などを用いることができる。

蛍光抗体法は、Monoclonal Antibodies: Principles and practice Third edition (Academic Press, 1996 年)、単クローン抗体実験マニュアル (講談社サイエンティフィック、1987 年) 等に記載された方法を用いて行うことができる。具体的には、分離した細胞あるいは組織などに、本発明のモノクローナル抗体を反応させ、さらにフルオレシニン・イソチオシアネート (FITC) あるいはフィコエリスリンなどの蛍光物質でラベルした抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定する方法である。

免疫酵素抗体法 (ELISA) は、分離した、細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識などを施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定する方法である。

放射性物質標識免疫抗体法 (RIA) は、分離した、細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、抗体を反応させ、さらに放射線標識を施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する方法である。

免疫細胞染色法、免疫組織染色法は、分離した、細胞あるいは組織などに、抗体を反応させ、さらにフルオレシニン・イソチオシアネート (FITC) などの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法である。

ウェスタンブロッティング法とは、Flt-1 を発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞の

細胞抽出液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動[Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]で分画した後、該ゲルをPVDF膜あるいはニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に本発明のモノクローナル抗体を反応させ、さらに FITC などの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗マウス IgG 抗体あるいは結合断片を反応させた後、確認する。

免疫沈降法とは、Flt-1 を発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞の細胞抽出液を本発明のモノクローナル抗体と反応させた後、プロテインG—セファロース等のイムノグロブリンに特異的な結合能を有する担体を加えて抗原抗体複合体を沈降させるものである。

サンドイッチ ELISA 法とは、本発明のモノクローナル抗体で、抗原認識部位の異なる2種類のモノクローナル抗体のうち、あらかじめ一方のモノクローナル抗体はプレートに吸着させ、もう一方のモノクローナル抗体は FITC などの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素で標識しておく。抗体吸着プレートに、Flt-1 を発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞の細胞抽出液を反応後、標識したモノクローナル抗体を反応させ、標識物質に応じた反応を行う方法である。

図面の簡単な説明

第1図 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1730 および KM1732 のヒト細胞株 KOPN-K、G361、CAPAN-1、HUVEC、HSB-2 および Jurkat との反応性をフローサイトメーターにより解析した結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

実施例1 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体の製造法

抗 Flt-1 モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ KM1732(FERM BP-5698)、ハイブリドーマ KM1730(FERM BP-5697)、ハイブリドーマ KM1731(FERM BP-5718)、ハイブリドーマ KM1748(FERM BP-5699)、および、KM1750(FERM BP-5700)をそれぞれ $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹をプリスタン処理した 8 週令ヌード雌マウス (Balb/c) の腹腔内に注射した。10~21 日後に、ハイブリドーマは腹水癌化した。腹水のたまったマウスから、腹水を採取 (1 ~ 8ml/匹) し、遠心分離 (3,000rpm、5 分間) して固形分を除去した後カプリル酸沈殿法 (アンチボディー・ア・ラボラトリー・マニュアル) により精製し、精製モノクローナル抗体とした。

モノクローナル抗体の抗体クラスはサブクラスタイピングキット [ザイメット (Zymed) 社製] を用いた酵素免疫測定法を行った。その結果、KM1732 はマウス IgG1

サブクラス、KM1730 はマウス IgG1 サブクラス、KM1731 はマウス IgG2a サブクラス、KM1748 はマウス IgG2b サブクラス、および、KM1750 はマウス IgG2b サブクラスに属するモノクローナルであった。

実施例 2 抗ヒト Flt-1 モノクローナル抗体のヒト癌細胞株との反応性の確認

ヒト由来癌細胞株としては、肺小細胞癌 SBC-3[Cancer Research, 54, 1511 (1994)]、SBC-5[Cancer Research, 54, 1511 (1994)]、肺扁平上皮癌 Calu-1[Cancer Research, 54, 1511 (1994)]、PC-10[Cancer Research, 54, 1511 (1994)]、肺腺癌 PC-7[Cancer Research, 54, 1511 (1994)]、HLC-1[Cancer Research, 54, 1511 (1994)]、大腸癌 Colo205 (ATCC CCL-222)、子宮癌 Hela (ATCC CCL-2)、卵巣癌 MCAS (ヒューマンサイエンス資源財団 JCRB 0240)、OVCAR-3 (大日本製薬より購入)、胃癌 MKN-1[Cancer Research, 46, 4438 (1986)]、KatoIII[Cancer Research, 46, 4438 (1986)]、乳癌 R27[Anticancer Research, 12, 1121 (1992)]、MCF7 (ATCC HTB-22)、膀胱癌 HPAF-2 (ATCC CRL-1997)、BXPC-3 (ATCC CRL-1687)、Capan-1 (ATCC HTB-79)、Capan-2 (ATCC HTB-80)、メラノーマ G361 (ATCC CRL-1424)、Sk-Mel-28 (ATCC HTB-72)、神経芽細胞腫 NAGAI[Cancer Research, 54, 1511 (1994)]、YT-nu[Cancer Research, 54, 1511 (1994)]、グリオブラストーマ A172 (ATCC CRL-1620)、T98G (ATCC CRL-1690)、白血病 Jurkat (ATCC TIB-152)、U-937 (ATCC CRL-1593)、HL-60 (ATCC CRL-240)、HSB-2 (ATCC CCL-120.1)、TALL-1[Cancer Research, 54, 1511 (1994)]、KOPN-K[Cancer Research, 54, 1511 (1994)]、NALL-1[Cancer Research, 54, 1511 (1994)]、HEL92.1.7 (ATCC TIB-180)、HPB-ALL[Cancer Research, 54, 1511 (1994)]、K562 (ATCC CCL-243)、CCRF-CEM (ATCC CCL-119)、CCRF-SB (ATCC CCL-120) を用いた。また、正常細胞としてヒトさい帯静脈由来の血管内皮細胞 (HUVEC) (Clonetics 社より購入) を用いた。

実施例 1 で得られた抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体のヒト癌細胞株に対する反応性を免疫細胞染色法を用いて以下の手順に従い確認した。

抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1730 および KM1732、ならびにコントロール抗体として、マウス IgG1 クラスに属し、かつヒト VEGF 受容体 Flt-1 には反応せず、ヒト MxA 蛋白質に反応するマウスモノクローナル抗体 KM1135(WO96/05230) を、常法に従いビオチン化標識した。

各細胞株 2×10^5 個を丸底 96 ウェルプレートに免疫細胞染色用緩衝液(1% BSA、0.02% EDTA、0.05% アジ化ナトリウムを含む PBS) 100 μ l に懸濁して分注した。4 °C、350 \times g で 1 分間遠心分離後、上清を除き、ビオチン化標識 KM1730 抗体、ビオチン化標識 KM1732 抗体またはビオチン化標識 KM1135 コントロール抗体をそれぞれ該ウェルに 50

μ l (10 μ g/ml) を添加し、4°Cで30分間反応させた。反応後、200 μ lの免疫細胞染色用緩衝液を各ウェルに加え4°C、350×gで1分間遠心分離後、上清を除き細胞の洗浄を行った。この洗浄操作をさらに2回行った後、Avidin-PE (Streptoavidin-R-Phycoerythrin)(Gibco社製)を5 μ g/mlの濃度を含む免疫細胞染色用緩衝液20 μ lを加えて4°Cで30分間反応させた。反応後、上記と同様の洗浄操作を3回行った後、フローサイトメーター(コールター社製)を用いて解析を行った。

結果を第1図および第1表に示す。

第 1 表

ターゲット細胞	反応性	
	抗Flt-1モノクローナル抗体	
	KM1730	KM1732
肺小細胞癌 SBC-3 SBC-5	- - -	- - -
肺扁平上皮癌 Calu-1 PC-10	- - -	- - -
肺腺癌 PC-7 HLC-1	- - -	- - -
大腸癌 Colo205	-	-
子宮癌 Hela	-	-
卵巣癌 MCAS OVCAR-3	- - -	- - -
胃癌 MKN-1 KatohII	- - -	- - -
乳癌 R27 MCF7	- - -	- - -
肝癌 HPAF-2 BXP-3 Capan-1 Capan-2	- - - -	- - - -

ターゲット細胞	反応性	
	抗Flt-1モノクローナル抗体	
	KM1730	KM1732
メラノーマ		
G361	-	-
Sk-Mel-28	-	-
神経芽細胞腫		
NAGAI	-	-
YT-nu	-	-
グリオブラストーマ		
A172	-	-
T98G	-	-
白血病		
Jurkat (T)	++	++
U-937 (Monocyte)	-	-
HL-60 (Promyelo)	-	-
HSB-2 (T)	++	++
TALL-1 (T)	-	-
KOPN-K (Null)	+	+
NALL-1 (Null)	-	-
HEL92.1.7 (Erythro)	-	-
HPB-ALL (T)	-	-
K562 (Myelo)	-	-
CCRF-CEM (T)	+	+
CCRF-SB (B)	-	-
正常血管内皮細胞		
HUVEC	+	+

第1図に示したように抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1730 および KM1732 は、KM1135 コントロール抗体に比べて、ヒト VEGF 受容体を発現している HUVEC-5620 細胞に反応した。白血病細胞である KOPN-K、CCRE-CEM、HSB-2、JURKAT についても、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1730 および KM1732 は、KM1135 コントロール抗体に比べ反応した。一方、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1730 および KM1732 は、G361 細胞、CAPAN-1 細胞には全く反応しなかった。

第1表には、同様にして検討した計 41 種類の細胞株の解析結果をまとめた。12 種類の白血病細胞については、4 種の細胞株 Jurkat、HSB-2、KOPN-K、CCRF-CEM に KM1730 および KM1732 が反応した。KOPN-K、CCRF-CEM については HUVEC と同等の反応性を示し、Jurkat、HSB-2 については HUVEC 以上の高い反応性を示した。反応した 4 種の白血病細胞のうち 3 種 (Jurkat、HSB-2、CCRF-CEM) は T 細胞系の白血病であり、1 種 (KOPN-K) は非 T 細胞非 B 細胞系の白血病であった。T 細胞系白血病については 5 種類検討したうち 3 種類と高率に反応した。一方、上皮細胞由来の腫瘍である肺腺癌、肺扁平上皮癌、大腸癌、子宮癌、卵巣癌、胃癌、乳癌、膀胱癌、および、神経外胚葉系由来腫瘍である肺小細胞癌、メラノーマ、神経芽細胞腫、グリオブラストーマについては計 24 種の癌細胞株を検討したが、抗 VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1730、KM1732 は全く反応しなかった。

産業上の利用可能性

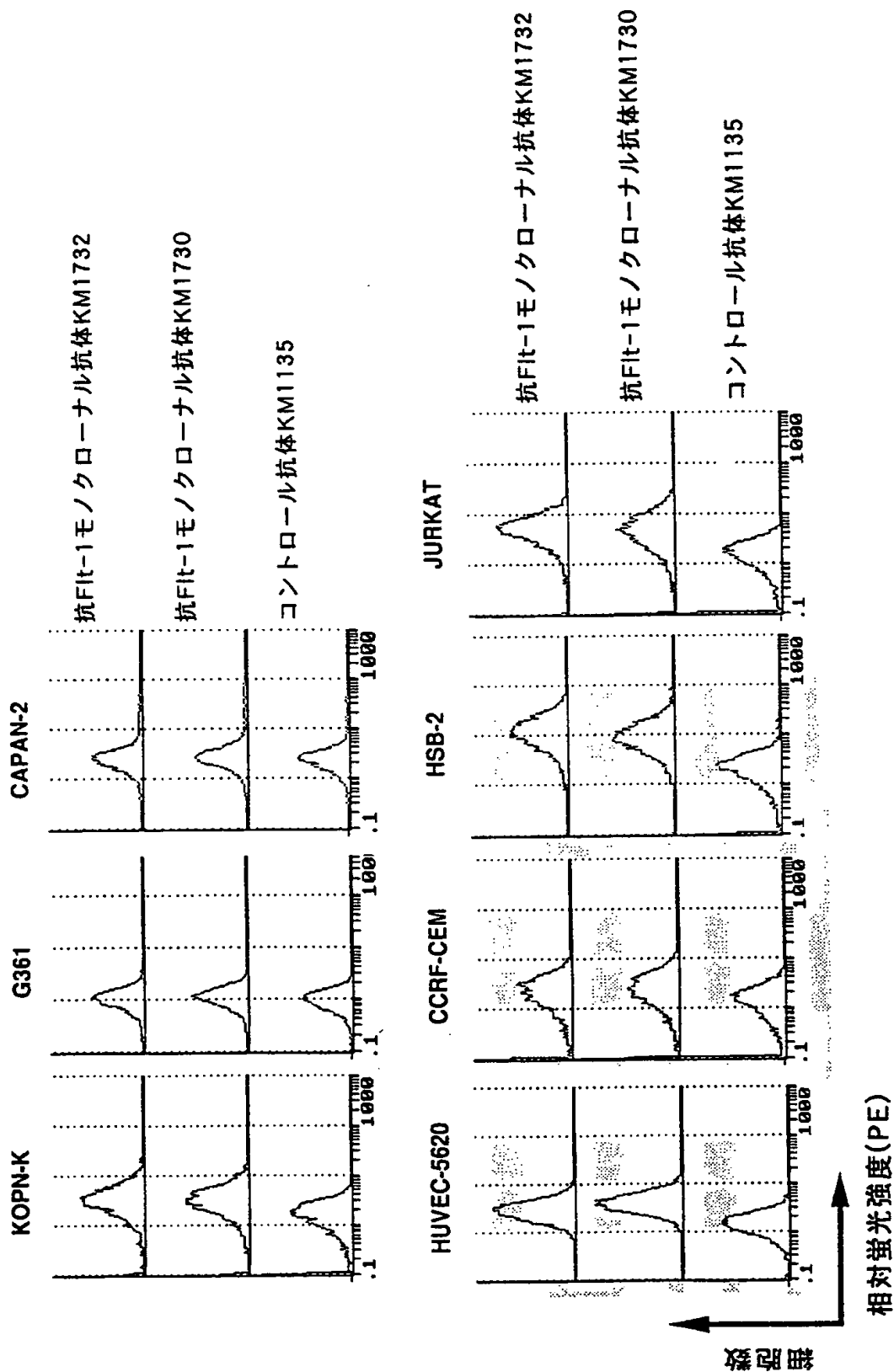
本発明は、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に結合するモノクローナル抗体を用いた白血病の診断薬および治療薬を提供する。

請求の範囲

1. 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体を有効成分として含有する白血病の診断薬。
2. 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 1 記載の診断薬。
3. 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、KM1730、KM1731、KM1732、KM1748 および KM1750 からなる群より選ばれる抗体である請求項 1 記載の診断薬。
4. 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、ヒト化抗体である請求項 1 記載の診断薬。
5. 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体およびジスルフィド安定化抗体からなる群より選ばれる抗体である請求項 1 記載の診断薬。
6. 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に融合させた抗体である、請求項 1 記載の診断薬。
7. 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体を有効成分として含有する白血病の治療薬。
8. 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 7 記載の治療薬。
9. 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、KM1730、KM1731、KM1732、KM1748 および KM1750 からなる群より選ばれる抗体である請求項 7 記載の治療薬。
10. 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、ヒト化抗体である請求項 7 記載の治療薬。
11. 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体およびジスルフィド安定化抗体からなる群より選ばれる抗体である請求項 7 記載の治療薬。
12. 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、放射性同位元素、蛋白質または低分子の薬剤と化学的または遺伝子工学的に融合させた抗体である、請求項 7 記載の治療薬。
13. 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体を用いる、白血病の診断方法。
14. 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 13 記載の白血病の診断方法。
15. 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、KM1730、KM1731、KM1732、KM1748 および KM1750 からなる群より選ばれる抗体である請求項 13 記載の白血病の診断方法。
16. 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、ヒト化抗体である請求項 13 記載の白血病の診断方法。
17. 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体およびジスルフィド安定化抗体からなる群より選ばれる抗体である請求項 13 記載の白血病の診断方法。
18. 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体が、放射性同位元素、蛋白質または低分子の

薬剤と化学的または遺伝子工学的に融合させた抗体である、請求項 1-3 記載の白血病の診断方法。

第 1 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01294

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N33/53, A61K39/395, 51/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ G01N33/53, A61K39/395, 51/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2000
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	W. T. BELLAMY, " EXPRESSION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND ITS RECEPTORS IN HEMATOPOIETIC MALIGNANCIES", CANCER RESEACH, VOL.59, NO.3, (1999), p.728-733	1-12
Y	W. FIEDLER, "VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR, A POSSIBLE PARACRINE GROWTH FACTOR IN HUMAN ACUTE MYELOID LEUKEMIA", BLOOD, VOL.89, NO.6, (1997), p.1870-1875	1-12
Y	WO, 98/22616, A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 28 May, 1998 (28.05.98) & EP, 882799, A	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
17 May, 2000 (17.05.00)

Date of mailing of the international search report
30.05.00

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01294

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 13~18
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Corresponds to a diagnostic method.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(1) Claims 1 to 6 pertain to diagnostics.
(2) Claims 7 to 12 pertain to remedies.
The groups (1) and (2) of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/01294

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/53, A61K39/395, 51/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/53, A61K39/395, 51/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2000年
日本国登録実用新案公報	1994-2000年
日本国実用新案登録公報	1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	W. T. BELLAMY, "EXPRESSION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND ITS RECEPTORS IN HEMATOPOIETIC MALIGNANCIES", CANCER RESEACH, VOL. 59, NO. 3, (1999), p. 728-733	1~12
Y	W. FIEDLER, "VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR, A POSSIBLE PARACRINE GROWTH FACTOR IN HUMAN ACUTE MYELOID LEUKEMIA", BLOOD, VOL. 89, NO. 6, (1997), p. 1870-1875	1~12
Y	WO, 98/22616, A (協和発酵工業株式会社) 28. 5月. 1998. (28. 05. 98) &EP, 882799, A	1~12

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 05. 00

国際調査報告の発送日

30.05.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

亀田 宏之



2J

9015

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 13~18 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
診断方法である。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4 (a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

(1) 請求の範囲 1-6 は診断薬に関するものである。
(2) 請求の範囲 7-12 は治療薬に関するものである。
そして、上記 (1) (2) の発明群が単一の一般的発明概念を形成をするように連関している一群の発明であるとは認められない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。